Die α-Isopropylmalat-Synthase in Hydrogenomonas eutropha H 16

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Jürgen Wiegel

aus Berlin-Spandau

Göttingen 1973

Die α-Isopropylmalat-Synthase in Hydrogenomonas eutropha H 16

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Jürgen Wiegel

aus Berlin-Spandau

Göttingen 1973

Diese Arbeit wurde im

Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen

durchgeführt

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. H. G. Schlegel

Korreferent: Prof. Dr. G. Gottschalk

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.73

ABKÜRZUNGEN

Ac-	Acetyl-
A-5'-DP	Adenosin-5'-diphosphat
A-2'(3';5')-MP	Adenosin-2'(3';5')-monophosphat
A-3':5'-MP	cyclisches Adenosinmonophosphat
A-5'-TP	Adenosin-5'-triphosphat
ATCC	American Type Culture Collection
α-KB	α-Ketobuttersäure
α-KIC	α-Ketoisocapronsäure
α-KNV	α-Keto-n-valeriansäure
BIS	N, N'-Methylenbisacrylamid
CM-	Carboxymethyl-
CoA-SH	Coenzym A
CNT	3-Carboxy-4-nitro-thiophenolat
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
DTNB	5, 5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
E	Enzymatische Einheit
ΔE_{nm}^{br}	Extinktionsänderung
E_A	Aktivierungsenergie nach Arrhenius für die enzymatische Bruttoreaktion
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
FAD	Flavinadénindinukleotid
IPM	α-Isopropylmalat
KIV	α-Ketoisovaleriansäure
MG	Molekulargewicht
NAD(H)	Nicotinamid-adenin-dinukleotid (reduziert)
NG	Naßgewicht abzentrifugierter Zellen
NMG	1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin
PALP	Pyridoxal-5-phosphorsäureester
PEP	Phosphoenolpyruvat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
~SCoA	Thioester des Coenzym A
TEA	Triäthanolamin
TES	Trichloressigsäure
TPP	Thiaminpyrophosphat
TRIS	Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534922_0036

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I EINLEITUNG	1
II METHODEN	4
III EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	38
1. Enzymaktivität der α-Isopropylmalat-Synthase und Regulation durch Repression und Derepression	38
1.1 Bestimmung der Enzymaktivität	38
1.1.1 Bestimmung der Aktivität im Fluoreszenztest	38
1.1.2 Bestimmung der Aktivität durch die optischen Tests bei 232 und 412 nm	41
1.2 Vergleich der Enzymaktivität	42
1.2.1 Die Enzymaktivität im Verlauf einer Wachstumsperiode	43
1.2.2 Vergleich der Enzymaktivität in Gegenwart von Aminosäuren und Ca-Pantothenat	44
1.2.3 Vergleich der Enzymaktivität bei Anzucht mit 2-Aminobuttersäure und Citraconsäure	49
1.2.4 Die Enzymaktivität in der Mutante A 81 von H. eutropha H 16 und den davon abgeleiteten Revertanten	51
1.3 Prüfung auf verschieden regulierte IPM-Synthasen in H. eutropha H 16	53
2. Die Anzucht von Zellmaterial für die Enzymanreicherung	55
3. Anreicherung der IPM-Synthase	56
3.1 Wahl der Aufschlußmethode	58
3.2 Adsorption der IPM-Synthase	59
3.3 Versuche zur Stabilisierung der IPM-Synthase	59
3.4 Fällung der Nukleinsäuren	63
3.5 Erste Ammoniumsulfatfraktionierung	63
3.6 Gelfiltration auf Sephadex G 150	63
3.7 Zweite Ammoniumsulfatfraktionierung	64
3.8 Erste Chromatographie an DEAE-Sephadex A 50	65

3.9 Zweite Chromatographie an DEAE-Sephadex A 50 67

3.10 Chromatographie an DEAE-Cellulose 67

3.11 Gelfiltration mit Sephadex G 200 68

3.12 Gelelektrophorese 69

3.12.1 Analytische Gelelektrophorese 69

3.12.2 Präparative Gelelektrophorese 71

3.12.3 Re-Gelelektrophorese 72

3.12.4 Gelelektrophorese in Gegenwart von KIV und Effektoren 74

3.13 Andere angewandte Methoden zur Proteinfraktionierung 74

4. Charakterisierung des Enzyms 78

4.1 Temperaturoptimum und Aktivierungsenergie 78

4.2 Kältelabilität 82

4.3 pH-Optimum 84

4.4 Isoelektrischer Punkt 87

4.5 Molekulargewichtsbestimmung 88

4.5.1 Sephadex G 200-Gelfiltration 88

4.5.2 Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation 89

4.5.3 Molekulargewichtsbestimmung in Gegenwart von L-Leucin 91

4.5.4 SDS-Gelelektrophorese 92

4.6 SH-Gruppen und Disulfidbrücken 93

4.6.1 Einfluß von SH-Reagenzien 93

4.6.2 SH-Gruppen-Titration 95

4.7 Aufnahme der Substratsättigungskurven 96

4.7.1 Substrat(KIV)-Sättigung 96

4.7.2 Substrat(Ac SCoA)-Sättigung 102

4.8 Der Einfluß der Produkte IPM und CoA-SH auf die Enzymaktivität 106

4.8.1 α-Isopropylmalat (IPM) 107

4.8.2 Coenzym A (CoA-SH) 110

4.8.3 Inaktivierung des Enzyms durch CoA-SH 113

4.9 Substratsättigungsmechanismus 115

4.10 Die Unspezifität der IPM-Synthase bezüglich ihrer Substrate α-Ketoisovaleriansäure und Acetyl~S-Coenzym A 117

4.10.1 Analoge und homologe Verbindungen des Substrates α-Ketoisovaleriansäure (KIV) 117

4.10.1.1 Substratsättigung der umgesetzten α-Ketosäuren 117

4.10.1.2 Hemmung durch nicht umgesetzte Homologe 120

4.10.1.3 Bindungsstelle am Substratmolekül 120

4.10.2 Acetyl~SCoenzym A-Homologe und Analoge 124

4.10.2.1 Bindungsstelle am Substratmolekül 124

4.10.2.2 Substratsättigung der Homologen 126

4.10.3 Mögliche Produkte der unspezifischen IPM-Synthase-Reaktion 134

4.10.4 Hemmbarkeit der Umsetzung der Homologen 134

4.10.5 Umsetzung der Homologen in physiologischen Konzentrationen 136

4.11 Einfluß von Aminosäuren auf die IPM-Synthase-Aktivität 137

4.11.1 Hemmung der IPM-Synthase-Aktivität durch das Endprodukt L-Leucin 137

4.11.1.1 pH-Abhängigkeit der Hemmung durch L-Leucin 139

4.11.1.2 Hemmung durch L-Leucin in Abhängigkeit der Konzentration unter verschiedenen Bedingungen 140

4.11.2 Die Wirkung verschiedener Aminosäuren auf die Enzymaktivität in An- und Abwesenheit von L-Leucin 145

4.11.3 Die Wirkung von L-Valin und L-Isoleucin 148

4.11.3.1 Die Wirkung von L-Valin und L-Isoleucin auf die Enzymaktivität ohne Zusatz von L-Leucin 148

4.11.3.2 Der Einfluß von L-Valin und L-Isoleucin auf die durch L-Leucin gehemmte IPM-Synthase-Aktivität 149

4. 11. 3. 3 Die Abhängigkeit der Wirkung von L-Valin von der Wasserstoffionenkonzentration 151

4. 11. 4 Der Einfluß der Aminosäuren L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin auf die Enzymaktivität in Abhängigkeit der Substrat(KIV)-Konzentration 153

4. 12 Der Einfluß von Intermediären auf die IPM-Synthase-Aktivität 155

4. 13 Der Einfluß von Metallionen auf die Enzymaktivität 156

4. 13. 1 Einwertige Metallionen 156

4. 13. 2 Zweiwertige- und Schwermetallionen 157

4. 14 Die Wirkung von Metall-komplexierenden Reagenzien 158

4. 14. 1 EDTA und EDTA-Metallkomplexe 158

4. 14. 2 Die Inaktivierung durch EDTA in Gegenwart der Substrate und Effektoren 161

4. 14. 3 Die Wirkung verschiedener Metall-Protein-Inhibitoren 163

4. 14. 4 Versuche zur Reaktivierung 164

4. 15 Der Einfluß von L-Leucin und L-Valin auf das Temperaturoptimum der Reaktionsgeschwindigkeit und auf die Aktivierungsenergie E_A^{br} der IPM-Synthase-Reaktion 166

4. 15. 1 Der Einfluß auf das Temperaturoptimum 166

4. 15. 2 Der Einfluß auf die Aktivierungsenergie 166

4. 15. 3 Der Einfluß der Aminosäuren auf die Temperaturanomalie 167

IV DISKUSSION 170

V ZUSAMMENFASSUNG 198

LITERATURVERZEICHNIS I

I. EINLEITUNG

Die ersten Informationen über die Leucinbiosynthese erhielt man durch Einbauversuche mit C^{14}-Acetat und C^{14}-Glucose bei Hefen (EHRENSVÄRD, 1951; ABELSON, 1955). STRASSMAN (1955/56) und Mitarbeiter formulierten dann nach diesen und anderen Isotopenmarkierungsversuchen an Torulopsis utilis den Biosyntheseweg für L-Leucin. Die einzelnen Enzyme und die entstehenden Zwischenprodukte der Leucinbiosynthese konnten hauptsächlich aber erst durch die Arbeitsgruppe um UMBARGER (JUNGWIRTH et al., 1961/1963; GROSS et al., 1962/1963/1965; CALVO et al., 1962; BURNS et al., 1963/1966; KOHLHAW et al., 1965) aber auch durch andere Autoren (MARTIN et al., 1962; STRASSMAN et CECI, 1963) bei verschiedenen Organismen nachgewiesen werden.

Die Leucinbiosynthese steht in enger Beziehung zu den Synthesen der beiden anderen verzweigten Aminosäuren L-Valin und L-Isoleucin. Diese drei Aminosäuren werden in einer verzweigten Biosynthesekette mit z.T. gemeinsamen Enzymen aufgebaut (s. Schema 1).

Die Isoleucinbiosynthese verläuft parallel zur Valinbiosynthese. Die Leucinbiosynthese zweigt bei der letzten Vorstufe des Valins, dem α-Ketoisovalerat, ab. Das erste spezifische Enzym für die Leucinsynthese ist die α-Isopropylmalat-Synthase (2-Oxoisovalerian-C-Acetyltransferase; E.C. 4.1.3.-;s.S. 192). Sie kondensiert unter Freisetzung von reduziertem Coenzym A Acetyl~SCoA und α-Ketoisovalerat zu α-Isopropylmalat (weiterhin als IPM abgekürzt).

Aus α-Isopropylmalat entsteht durch Isomerisierung zu ß-Isopropylmalat und anschließender Decarboxylierung α-Ketoisocaproat.

Dieses wird anschließend durch die Transaminase B (RUDMAN und MEISTER, 1953; HILL, 1968) in die Aminosäure L-Leucin überführt.

Die Regulierung einer Biosynthesekette erfolgt häufig durch das erste Enzym, welches nur für e i n Endprodukt verantwortlich ist: die Threonindesaminase für L-Isoleucin und die α-Isopropylmalat-Synthase (IPM-Synthase) für Leucin. Für L-Valin fehlt ein solches Enzym, denn die

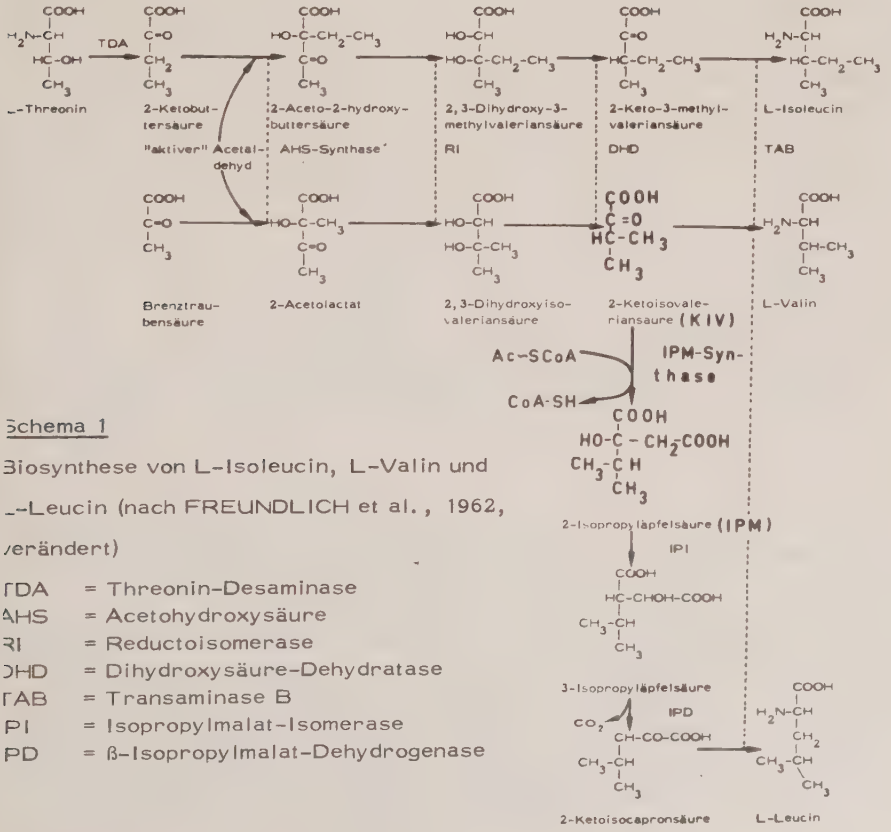
Transaminase B, das erste Enzym nach der Verzweigung, reagiert mit allen drei entsprechenden α-Ketosäuren (RUDMAN und MEISTER, 1953; HILL, 1968). L-Valin wird wohl hauptsächlich über die α-Acetohydroxysäure(AHS)-Synthase (s. Schema 1) reguliert.

Nachdem für H. eutropha H 16 (A. eutrophus H 16) als einem Vertreter der chemolithotrophen Bakterien die Regulation der Synthese von L-Isoleucin und L-Valin untersucht worden war (REH, 1967), hatte HILL (1968) begonnen, die Regulation der Biosynthese von L-Leucin aufzuzeigen. Die Leucinbiosynthese wird auch in H. eutropha H 16 anscheinend über das erste Enzym, die IPM-Synthase, gesteuert. HILL hatte dieses Enzym in unbehandelten Rohextrakten untersucht. Es erwies sich dabei als äußerst interessant. Einbauversuche mit markiertem Acetat wiesen auf eine große Unspezifität der IPM-Synthase bei der Auswahl des α-Ketosäuresubstrates hin. Diese Eigenschaft mußte nun durch Experimente mit dem gereinigten Enzym aus H. eutropha H 16 bewiesen werden. Es hatte auch den Anschein, daß das Enzym nicht nur durch L-Leucin gehemmt (Feedback-Inhibition), sondern auch durch L-Valin aktiviert werden konnte. L-Valin war bisher für die IPM-Synthase noch nicht als positiver Effektor beschrieben worden. Eine Wachstumshemmung durch den Antimetaboliten Trifluorleucin wurde nicht nur durch L-Leucin, sondern auch durch L-Valin aufgehoben (HILL, 1968). Dies war ein erster Hinweis auf eine Regulation der IPM-Synthase aus H. eutropha H 16, die sich von der aus anderen Organismen unterscheidet.
Bei Beginn der vorliegenden Arbeit war die IPM-Synthase nur aus Neurospora crassa (WEBSTER et al., 1965), Salmonella typhimurium (KOHLHAW et al., 1969) und aus Saccharomyces carlsbergensis (SAI et al., 1969) gereinigt und teilweise charakterisiert worden. Für das Enzym aus anderen Organismen fehlten detaillierte Untersuchungen.
Inzwischen liegt die IPM-Synthase auch aus Saccharomyces spec. (ULM et al., 1972) und aus Micrococcus denitrificans (FISCHER, 1973) in teilweise gereinigter Form vor.

Das Enzym aus S. typhimurium ist intensiv untersucht worden. So verläuft dort parallel zur Leucinhemmung eine reversible Dissoziation des Enzyms in Untereinheiten (LEARY und KOHLHAW, 1970). Interessant war nun die Frage, ob die Hemmung durch L-Leucin in anderen Organismen, insbesondere in anderen Bakterien, über denselben Mechanismus abläuft, oder ob es sich dabei um einen speziellen Fall handelte.

Für derartige Untersuchungen sollte ein möglichst weitgehend gereinigtes Enzym verwendet werden.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich daher vor allem mit der Anreicherung der IPM-Synthase aus H. eutropha H 16 und der Charakterisierung dieses Enzyms, besonders in Hinsicht auf seine katalytischen und regulatorischen Eigenschaften.



Schema 1

Biosynthese von L-Isoleucin, L-Valin und L-Leucin (nach FREUNDLICH et al., 1962, verändert)

TDA = Threonin-Desaminase
AHS = Acetohydroxysäure
RI = Reductoisomerase
DHD = Dihydroxysäure-Dehydratase
TAB = Transaminase B
PI = Isopropylmalat-Isomerase
PD = ß-Isopropylmalat-Dehydrogenase

II. METHODEN

1. Organismen

Die Untersuchungen erfolgten an Hydrogenomonas eutropha H 16 (ATCC 17699; WILDE, 1962) und an den davon abgeleiteten Mutanten H. eutropha H 16 - A 81 (H 16 - A 81; REH, 1967; $ileu^-$, val^- doppelauxotroph) und H. eutropha H 16 - NG 101 (mit einer IPM-Synthase, die durch L-Leucin nicht mehr gehemmt wurde).

2. Nährlösungen und Anzucht

2. 1 Nährlösungen

Hydrogenomonas H 16 wurde in folgendem Mineralmedium nach SCHLEGEL et al. (1961) kultiviert:

(1)	$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	0,9 %
	KH_2PO_4	0,15 %
(2)	NH_4Cl	0,1 %
	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,02 %
(3)	$FeNH_4$-Citrat	0,0005 %
	$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,001 %
(4)	Spurenelementlösung (SL 4) nach PFENNIG und LIPPERT (1966): 1 ml/l	

Die Nährlösungen wurden in destilliertem Wasser angesetzt, wobei sich die oben angegebenen Prozentwerte auf die fertige Nährlösung beziehen.
Die einzelnen Lösungen wurden getrennt 30 min bei 121° C autoklaviert.
Für autotrophes Wachstum wurde der Nährlösung 0,05 % $NaHCO_3$ zugegeben.
Die Kultur wurde während des Wachstums mit einem Gemisch aus 80 % H_2, 10 % O_2 und 10 % CO_2 begast.
Bei heterotropher Anzucht des Wildtyps wurde der Nährlösung 0,5 % Fructose zugegeben, bei der Anzucht der Mutante H 16 - A 81 außerdem je

1 mmol L-Isoleucin und L-Valin.
Komplexmedien bestanden aus 0,9 % Fleischextrakt (Nutrient Broth-Difco) und 0,5 % NaCl.
Die größeren Nährlösungsvolumina für 10 l-Fermenter wurden sterilfiltriert (Seitz-Filter), die Spurenelementlösung und Eisen-Ammonium-Citrat wurden jedoch getrennt autoklaviert und zur sterilen Nährlösung zugefügt.

Feste Nährböden wurden durch den Zusatz von 1,5 % Agar (Difco) erhalten.

2.2 Anzucht der Zellen

Die Anzucht bis zu 1000 ml erfolgte in Erlenmeyerkolben mit Schikanen und langem Halsansatz auf einem Rotationsschüttler (3000 - 4000 U/min) bei 28° C.
Die autotrophe Anzucht von Vorkulturen erfolgte in Witt'schen Töpfen, die alle 10 h mit dem Gasgemisch neu gefüllt wurden.
Größere Zellanzuchten für die Enzymanreicherung erfolgten unter Derepressionsbedingungen im 10 l-Fermenter (Microferm, Fa. New Brunswick, N. J., USA, bei 400 U/min, 4 l Luftzufuhr/min und 30° C), im 8 l-Fermenter (Biostat, Fa. Braun, Melsungen), mit 6 - 7 l Luftzufuhr/min, bei 400 - 500 U/min und 31 - 32° C und im 100 l-Fermenter (AG für biologische Verfahrenstechnik, Basel).

2.2.1 Anzucht unter Derepressionsbedingungen

Zur Anzucht im Kleinfermenter (8 - 10 l) wurde jeweils von der Stammkultur aus dem Schrägröhrchen eine Kultur auf Fructose-Mineral(FM)-Agarplatten mit L-Leucin und L-Valin (je 2 mM) angelegt. Gleichzeitig wurde, zur Kontrolle auf Revertanten, ein Ausstrich auf reinen FM-Agarplatten gemacht. Nach zwei bis drei Tagen wurden 10 ml Fructose-Mineral- oder Nutrient-

Broth-Medium, beide mit L-Valin und L-Isoleucin (je 2 mM) versetzt, mit einer kleinen Kolonie von den Aminosäure enthaltenden Platten angeimpft. Nach 20 - 24 h wurde dann die Kultur in 150 ml des gleichen Mediums und nach weiteren 16 - 18 h in 1000 ml FM-Nährlösung (mit je 1 mM an L-Valin und L-Isoleucin) überführt. Der 8 oder 10 l-Fermenter mit FM-Medium und je 0,25 mM an L-Valin und L-Isoleucin wurde nach weiteren 14 - 16 h beimpft. Mit Hilfe einer Pumpe (DCL-Micro Pump Type T, F.A. Hughes & Co. Ltd., Epson Surrey, England) und eines Zeitgebers (Phillips, Witropuls) wurden L-Valin und L-Isoleucin so zugetropft, daß nach 30 h je 0,5 mmol je Liter Nährlösung zugegeben waren. Nach weiteren 5 h wurde dann mit der Cepa-Durchlaufzentrifuge (32 000 g) geerntet. Die Ausbeute an Zellen betrug ca. 3 g NG/l Nährlösung.

Für die Anzucht im 100 l-Fermenter wurden 15 Schrägröhrchen (FM-Medium, je 2 mM an L-Valin und L-Isoleucin; 60 h alt und auf Revertanten geprüft) mit steriler Saline abgeschlemmt. Damit wurden 8 l FM-Nährlösung mit je 1 mM L-Valin und L-Isoleucin beimpft. Nach 19 h Wachstum wurde mit dieser Kultur ein 100 l-Fermenter beimpft. L-Valin und L-Isoleucin wurden wie beim 10 l-Fermenter zugetropft. Nach 36 h wurde auf 4 - 5° C abgekühlt (Westfalia Einhängekühler) und mit einem Durchlaufseperator (Westfalia, Herne) und anschließender Zentrifugation (WKF-Becherzentrifuge, 6 x 800 ml, 20 min bei 14 000 g) geerntet. Die Ausbeute betrug 500 g NG.

3. Bestimmung der Zelldichte

Die Gesamtzellzahl einer Bakteriensuspension wurde durch Auszählen in der Neubauer-Zählkammer ermittelt; die Keimzahlbestimmung erfolgte nach Verdünnung in physiologischer NaCl-Lösung durch Ausspateln auf FM-Agar und Auszählen der gewachsenen Kolonien nach drei Tagen. Die Zelldichte einer Kultur wurde durch Trübungsmessung in einem Zeiss-Spektralphotometer PM 4 bei 436 nm und bei 1 cm Schichtdicke gegen eine unbeimpfte

Nährlösung (mit 0,1 % NaN_3 versetzt) gemessen. Die Suspension wurde so verdünnt, daß unterhalb einer Extinktion von 0,35 gemessen werden konnte; in diesem Bereich besteht eine lineare Beziehung zwischen Trübung und Zellzahl.

4. Isolierung von 5'5'5'-Trifluorleucin resistenten Mutanten mit einer für L-Leucin insensitiven IPM-Synthase

4.1 Mutationsauslösung mit 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin (NMG) und Ausprägung des Genotyps

50 ml einer Suspension (ca. 3×10^{-8} Zellen in der logarithmischen Phase) von H. eutropha H 16, Wildtyp, wurden 30 min mit 50 µg/ml NMG inkubiert; danach wurden die Zellen durch Waschen mit FM-Medium weitgehend vom mutagenen Agens befreit und in 15 ml Nährlösung suspendiert. Mit je 0,1 ml dieser Suspension wurden 50 x 10 ml Nährlösung angeimpft. Zur Ausprägung des Genotyps wurde dann 12 h bei 28° C inkubiert.

4.2 Anreicherung und Selektion

Von jedem Kölbchen wurden je 0,1 ml auf FM-Agarplatten mit 5×10^{-4} bzw. 2×10^{-3} mM Trifluorleucin ausgespatelt. Nach 7 Tagen wurden alle Kolonien, die Satellitenwachstum zeigten, mit Holzstäbchen auf jeweils drei FM-Agarplatten überimpft. Je eine der Platten war vorher mit Weichagar, der die für L-Valin und L-Isoleucin doppelauxotrophe Mutante H 16 - A 81 (REH, 1967) enthielt, und je eine mit Weichagar mit der L-Leucin auxotrophen Mutante Arthrobacter St. 23 - M 41 (BAUMGARTEN, 1969), überschichtet worden.

Unter den nur L-Leucin ausscheidenden Mutanten sollten die gewünschten Mutanten zu finden sein.

Von den 250 überimpften, ausscheidenden Mutanten waren nur neun, die nicht

die Mutante H 16 - A 81 fütterten. Diese Mutanten wurden durch Ausstreichen auf Trifluorleucin-haltigen (3×10^{-4} M) FM-Agarplatten gereinigt. Zur Prüfung auf die Enzymeigenschaft wurden die Mutanten in 1 l Kulturen (FM-Medium) angezogen. Im zellfreien Extrakt wurde die Hemmung der IPM-Synthase durch L-Leucin geprüft.

5. Bereitung zellfreier Extrakte

5.1 Ultraschallbehandlung

Die bei - 20° C aufbewahrten Zellen wurden in $(K, H)_3PO_4$-Puffer (250 mM, pH = 7,5 - 7,8, mit 2 mM α-Ketobuttersäure und 5 mM L-Valin) suspendiert (1 g NG Zellen/2 ml Puffer). Diese Suspension wurde mit einem Ultraschallgerät der Fa. Schoeller und Co., Frankfurt a.M., mit 70 % der maximalen Leistung 45 sec/ml Suspension beschallt. Die Temperatur wurde mit einem Ultrakryomaten (TK 30 D, Meßgerätewerk Lauda) unter 7° C gehalten. Für größere Mengen wurde die Durchflußkammer des Gerätes mit kontinuierlicher Beschallung verwendet. Die Temperatur konnte dabei im Extrakt unter 6° C gehalten werden. Durch Zusatz von Al_2O_3 (10 - 20 mg/ml Extrakt) konnte die Beschalldauer in der kontinuierlichen Kammer bei gleicher Ausbeute auf unter 15 sec/ml gesenkt werden.
Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (30 min bei 25 000 g bei 0 - 4° C) abgetrennt. Die Proteinkonzentration betrug 20 - 25 mg/ml.

5.2 Aufschluß mit Aluminiumoxyd

Die gefrorenen Zellen wurden mit 2 g Alcoa 303/g NG Zellen miteinander verrieben, bis eine homogene Masse entstanden war (ca. 15 - 30 min). Diese wurde in 2 - 3 ml 250 mM TRIS/HCL-Puffer (pH = 7,8, mit 5 mM L-Valin) pro g NG Zellen aufgenommen. Das Aluminiumoxyd wurde durch Zentrifugation von 5 min bei 5 000 g abgetrennt; die Zelltrümmer wurden anschließend

durch 30 min lange Zentrifugation bei 25 000 g und 0 - 4° C entfernt.

5.3 Aufschluß mit der Frenchpresse

Die Zellsuspension (1 g NG Zellen/ 2 ml Suspension) wurde mit DNase versetzt, in eine auf 0° C vorgekühlte Frenchpresse gegeben und mehrmals mit einem Druck von 8 t/cm^2 bei 0° C durchgepresst. Bis zum 4. Durchpressen ergab sich eine ansteigende Aktivität der IPM-Synthase.
Die Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte wie unter II. 5. 1.

5.4 Aufschluß mit Glaskugeln

Die gefrorenen Zellen wurden mit 1 ml $(K,H)_3PO_4$-Puffer (Zusätze wie unter 5. 1)/g NG Zellen und 1,5 ml Glaskugeln (Ballotini 31/32)/g NG Zellen im MSE-Homogenisator mit maximaler Geschwindigkeit gerührt. Die Temperatur in der Suspension wurde durch Kühlung mit einem Aceton-Eis-Gemisch unter 6° C gehalten.
Bei 40 ml Zellsuspension betrug die Aufschlußzeit 20 min.
Die Kugeln wurden durch Zentrifugation (5 min bei 5 000 g) abgetrennt. Um eine gute Ausbeute zu erhalten, mußten die Kugeln noch dreimal mit Puffer (50 ml) gewaschen werden. Die vereinigten Extrakte wurden dann durch Zentrifugation (25 min, 25 000 g) von Zelltrümmern befreit.
Die Proteinkonzentration betrug je nach der zum Waschen verwendeten Puffermenge 10 - 18 mg Protein/ml.

5.5 Behandlung des Rohextraktes

Für Rohextraktuntersuchungen wurde das Überstehende der Zentrifugation (30 min, 25 000 g) durch Gelfiltration über Sephadex G 25 fine von nieder-

molekularen Effektoren befreit. Für eine einfache Entsalzung wurden für 5 ml Extrakt 13 ml Gel, für die Abtrennung von Substrat und Effektoren für 5 ml Extrakt 80 - 100 ml Gel verwendet.
Das Gel war vorher mit 250 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer und ggf. mit den verwendeten Zusätzen äquilibriert worden.
Für die Anreicherung wurde der unbehandelte Rohextrakt zur Ammoniumsulfatfraktionierung eingesetzt.

6. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte:
1) nach BEISENHERZ et al., 1953
2) nach LOWRY et al., 1951
   (Folin-Ciocalteus-Phenolreagens, Fa. Merck 9001)
   Das Protein wurde, um störende Ionen abzutrennen, mit 3 % TES ausgefällt und in H_2O erneut aufgenommen,
3) nach WARBURG und CHRISTIAN, 1941.

7. Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die spezifische Aktivität wurde in Einheiten pro g (E/g) Protein angegeben, wobei eine Einheit die Enzymmenge ist, die bei 30° C unter den angegebenen Testbedingungen 1 µmol Substrat/min umsetzt.

7.1 α-Isopropylmalat-Synthase (IPM-Synthase) (E.C. 4.1.3.-) (vergl. S. 192/193)

7.1.1 Ermittlung der Aktivität durch Bestimmung des gebildeten Produktes IPM

Der Test wurde nach Angaben von STRASSMAN und CECI (1963) sowie von

CALVO et al. (1969) ausgearbeitet und standardisiert.

In ein Zentrifugenglas mit Schraubverschluß wurden folgende Lösungen (mit bidest. Wasser hergestellt) einpipettiert:

0,2 ml	1,25 M TRIS/HCl-Puffer, pH = 7,5	(250 µmole)
	1,25 M KCl	(250 µmole)
0,1 ml	0,2 M α-Ketoisovalerat (KIV)	(20 µmole)
0,1 ml	0,2 M Acetylphosphat, Li_3-Salz	(20 µmole)
0,2 ml	Coenzym A (1 mg/ml)	
0,01 ml	Phosphotransacetylase (1 mg Prot./ml)	
0,39 ml	bidest. Wasser	

Der Testansatz wurde bei 30° C (bzw. Temperatur wie angegeben verändert) im Wasserbad vorinkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,05 ml Enzymlösung gestartet. Nach weiterer Inkubation von 20 min bei 30° C wurde die Reaktion mit 0,05 ml H_2SO_4 konz. gestoppt und die Probe mit 5 ml kaltem Äther versetzt. Das gebildete Produkt IPM wurde durch kräftiges Schütteln (2 min) in die organische Phase überführt. Zur klaren Trennung der Phasen wurde das Gemisch auf 0° C abgekühlt und 1 min bei 5 000 U/min zentrifugiert; das Protein befand sich nun zwischen den beiden Phasen. Von der organischen Phase wurde 1 ml in ein Reagenzglas überführt und bei 60° C im Wasserbad abgedampft.
Der Rückstand wurde in 0,4 ml H_2SO_4 konz. aufgenommen, 5 min bei 60° C inkubiert (Decarboxylierung zu ß-Ketoisocapronsäure) und nach Abkühlung im Eisbad mit 0,25 ml einer 20 %igen Resorcinlösung (0° C) versetzt. Die Ausbildung des Umbelliferonderivates erfolgte durch anschließende Inkubation bei 60° C. Nach 20 min wurde der Ansatz mit 5 ml H_2O verdünnt und damit die Reaktion beendet. 0,5 ml dieser Verdünnung (Eichkurve 1) wurden in ein Reagenzglas übertragen und mit 9,5 ml Borat-Carbonat-Puffer versetzt (0,6 M Na_2CO_3/0,15 M H_3BO_3).

Bei geringen Enzymaktivitäten wurden folgende Modifikationen des Testes

durchgeführt:

a) Die Inkubationsdauer des Testes wurde auf 40 - 50 min und die Temperatur z.T. auf 37° C erhöht.

b) Anstelle von 1 ml wurden 2 ml Ätherextrakt eingesetzt.

c) Das Aliquot der sauren Umbelliferonlösung wurde von 0,5 ml auf 2 ml erhöht und mit einem konzentrierten Borat-Carbonat-Puffer versetzt (0,3 M Borsäure in gesättigter Na_2CO_3-Lösung).

d) Zur Berechnung des gebildeten Produktes IPM wurde die Eichkurve 2 verwendet.

Nach Zugabe des Puffers mußte sofort die Fluoreszenz gemessen werden, da die Intensität in der alkalischen Lösung schon nach 2 bis 3 min merklich abnahm.
Bei Verwendung eines Puffers mit pH = 9,5 war die Lösung 5 h stabil, die Fluoreszenzintensität war aber nicht mehr maximal.
Die saure Lösung ohne Pufferzusatz war im Kühlschrank über Wochen stabil.

Die Fluoreszenz wurde im Eppendorf-Photometer (Netteler & Hinz, Hamburg) mit Fluoreszenzzusatz bestimmt. Die Wellenlänge des anregenden Lichtes betrug 366 nm (Quecksilberlampe, Primärfilter Hg 366); das Fluoreszenzlicht wurde durch ein Sekundärfilter (450 - 3 000 nm) gefiltert. Die Proben wurden in Quarzküvetten (QS) gegen einen Glasstandard (Eppendorf 4617), dessen Fluoreszenz auf 100 Einheiten (voller Anschlag des Photometers) eingestellt war, gemessen.
Höhere Meßwerte (Fluoreszenz über 100 E) wurden durch Benutzung des Stufenschalters (4 Stufen ergaben einen Skalenbereich von 100 - 1 000 E) bestimmt, da eine Verdünnung des Ansatzes keine lineare Beziehung zwischen Fluoreszenz und Verdünnungsgrad ergab.
Die Eichkurven wurden mit synthetischem DL-α-Isopropylmalat aufgenommen.

Die Ansätze enthielten dafür in 1 ml H_2O

0 - 500 µg DL-α-Isopropyläpfelsäure

20 µmole KIV

10 µmole K-Acetat

250 µmole TRIS

250 µmole KCl

1 mg Rinderserumalbumin

Das IPM wurde nach der oben angegebenen Methode extrahiert und zum 4-Isopropylumbelliferon umgesetzt, dessen Fluoreszenz dann wie angegeben bestimmt wurde. In einer doppelten Probe wurde geprüft, ob der Ersatz von CoA-SH, Acetyl-PO_4 und Phosphotransacetylase durch K-Acetat einen Einfluß auf die Bestimmung von IPM in den Eichkurven hatte; es konnte kein Effekt gemessen werden.

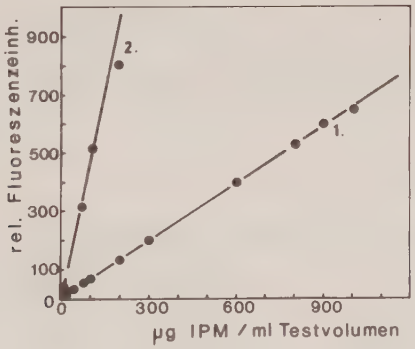


Abb. 1 Eichkurven für die Bestimmung der IPM-Synthase im fluorimetrischen Test

1) Eichkurve für Extrakte mit höherer Aktivität
2) Eichkurve für Extrakte mit niedriger Aktivität

Eingesetzt wurde synthetisches IPM und, anstelle von Enzymlösung, 2 mg Rinderserumalbumin.

7.1.2 Ermittlung der Aktivität durch Bestimmung der CoA-SH-Bildung bei 232 nm (verändert nach OCHOA, 1955 und KOHLHAW et al., 1969)

Der Testansatz enthielt in 1 ml (wenn nicht anders angegeben: pH = 8,0):

250 µmole TRIS/HCl oder 250 µmole $(K,H)_3PO_4$
1,5 µmole KIV
ca. 0,25 µmole Ac~SCoA

Der Start des Tests erfolgte durch Zugabe des Enzyms. Die Hydrolyse von Ac~SCoA mußte berücksichtigt werden. 1 µmol Substratumsatz entsprach einer Extinktionsänderung von 5,4.

Zur Messung wurden das Zeiss-Photometer PMQ II, Quarzküvetten Q I und QS sowie ein TE-Wandler (Zeiss) mit einem Kompensationsschreiber Servogor verwendet. Die Wellenlänge betrug 232 nm.

7.1.3 Ermittlung der Aktivität durch Bestimmung der CoA-SH-Bildung bei gleichzeitiger Reaktion der SH-Gruppe mit DTNB (verändert nach CALVO, 1969 und ROBYT et al., 1971)

Der Testansatz enthielt in 1 ml (pH = 8,0 - 8,2):

250 µmole TRIS/HCl oder 250 µmole $(K,H)_3PO_4$
20 µmole KIV
1 µmol Ac~SCoA
1 µmol DTNB

Der Start des Tests erfolgte durch die Zugabe des Enzyms. Nach Abzug der Hydrolyse von Ac~SCoA entsprach eine Extinktionsänderung von $11,4 \pm 0,6$ (ROBYT et al., 1971)(bzw. 13,6 (ELLMAN, 1959)) einem Substratumsatz von 1 µmol.

Für Routinetests z.B. bei der Säulenchromatographie wurde der Testansatz

verkleinert. Der Testansatz enthielt im Endvolumen von 0,5 ml:

125 µmole TRIS/HCl-Puffer, pH = 8
0,5 µmol DTNB
ca. 0,1 µmol Ac~SCoA
0,75 µmol KIV

Gestartet wurde mit 100 µl Säuleneluat.

Der Ablauf der Reaktionen wurde bei 412 nm im Zeiss-Spektralphotometer (PM 4 oder PM Q II) verfolgt. Die Registrierung erfolgte über einen TE-Wandler (Zeiss) mit einem Kompensationsschreiber (Servogor).

7.2 Acetohydroxysäure-Synthase (AHS-Synthase)
(nach REH, 1967 und unveröffentlichte Vorschrift)

7.2.1 Bereitung von zellfreien Extrakten

Geerntete und zweimal mit Phosphatpuffer gewaschene Zellen wurden in einem kleinen Volumen von 0,050 M Phosphatpuffer (pH = 7,6) mit 5 % Glycerin, 2 mM $MgCl_2$ und 1 mM EDTA suspendiert und bei - 20° C bis zur Verwendung aufbewahrt.
Zur Bereitung von zellfreien Extrakten wurden die Zellen aufgetaut, abzentrifugiert, in 5 ml 0,067 M Phosphatpuffer (pH = 7,6), 1 mM PALP und 1 mM EDTA enthaltend, pro 1 ml gepackte Zellen aufgenommen und mit Hilfe der Frenchpresse aufgeschlossen. Die Zellen wurden zweimal mit 8 Tonnen Druck durchgepreßt. Der Suspension war vorher DNase zugesetzt worden. Die so aufgeschlossenen Zellen wurden mit 20 000 g 30 min lang zentrifugiert. Der klare, rotbraun gefärbte Überstand wurde durch Gelfiltration von niedermolekularen Bestandteilen befreit. Für 5 ml Extrakt wurden 13 ml Sephadex G 25 fine verwendet. Das Gel war mit obigem Puffer äquilibriert.

7.2.2 Messung der AHS-Synthase-Aktivität (verändert nach UMBARGER und BROWN, 1958)

In ein Zentrifugenglas wurden pipettiert:

0,65 ml	0,1 M TRIS, pH = 9,0		
0,21 ml	einer Mischung von	2 ml	0,5 M Pyruvat
		2 ml	0,05 M $MgCl_2$
		0,2 ml	10 mg/ml TPP
		0,02 ml	0,5 mg/ml FAD

H_2O ad 1 ml

Der Start des Testes erfolgte mit 0,05 ml Rohextrakt (~10 mg Protein/ml). Nach 15 bzw. 20 min Inkubation bei 30° C wurde die Reaktion mit 0,3 ml 20 %igerTES gestoppt. Der Proteinniederschlag wurde bei 4000 U/min in 3 min abzentrifugiert, der Überstand in ein Reagenzglas überführt und zur Decarboxylierung der α-Acetomilchsäure 15 min in einem Wasserbad bei 60 - 65° C gehalten. Das entstandene Acetoin wurde im folgenden nach WESTERFELD (1945) bestimmt:

0,25 ml Überstand
2,25 ml H_2O
0,50 ml 0,5 %ige Kreatinlösung
0,50 ml 5 %ige α-Naphthollösung in 2,5 M NaOH

(unmittelbar vor Gebrauch angesetzt) wurden zusammengegeben und genau 60 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Dann erfolgte die Extinktionsmessung bei 546 nm gegen einen Reagenzienleerwert aus 2,5 ml H_2O, 0,5 ml Kreatinlösung und 0,5 ml α-Naphthollösung. Die gebildete Acetoinmenge wurde aus einer Eichkurve, die mit einer Acetoinstandardlösung erhalten wurde, ermittelt.

7.3 Fructose-1,6-diphosphat-Aldolase E.C.4.1.2.7

Boehringer Information 1964 (nach RACKER, 1947)

2,85 ml TEA-Puffer, pH = 7,6, 0,05 M
0,05 ml $NADH_2$ (10 mg/ml)
0,05 ml Fructose-1,6-diphosphat (Na-Salz, 30 mg/ml)
0,02 ml Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase/Triosephosphat-Isomerase (2 mg/ml)
0,01 ml Enzymlösung

Die Extinktionsänderung wurde bei 366 nm verfolgt.

7.4 Katalase E.C.1.11.1.6

Boehringer Information 1962 (nach BERGMEYER, 1955)

2,98 ml Peroxidlösung (pH = 7,0; 0,05 ml Perhydrol-Merck mit 0,05 M $(KH)_3PO_4$-Puffer auf 50 ml auffüllen)
0,02 ml Enzymlösung

Die Extinktionsabnahme wurde bei 240 nm gemessen.

8. Herstellung von Substraten und Substratanalogen

8.1 Darstellung des Methylester von KIV

0,2 mMole freie α-Ketoisovaleriansäure wurden mit einer ätherischen Lösung von Diazomethan bis zur bleibenden schwachen Gelbfärbung versetzt. Nach Entfernen des Äthers wurde der Ester im 1 ml bidestilliertem Wasser mit 1 % Äthanol aufgenommen. Das Diazomethan wurde von R. Gebauer (Institut für Mikrobiologie, Göttingen) nach de BOER (1954) hergestellt.

8.2 Acylierung von CoA-SH-Verbindungen

8.2.1 Darstellung kleinerer Mengen von Acetyl~SCoA (*)

5 - 10 mg CoA-SH wurden in 1 ml H_2O und 1 ml 1 M $KHCO_3$ gelöst. 0,2 ml Acetanhydrid wurden schnell unter Schütteln mit 10 ml H_2O (0° C) gemischt. 0,2 ml dieser Lösung wurden sofort zur CoA-SH-Lösung hinzugefügt. Die Acetylierung war nach 5 min beendet. Sie erfolgte dabei nicht immer vollständig, so daß noch Spuren CoA-SH in der Präparation vorhanden waren.

8.2.2 Darstellung größerer Mengen an Acetyl~SCoA sowie anderer Acyl~SCoA-Verbindungen

25 - 200 mg CoA-SH wurden in 3 - 10 ml H_2O (0° C) aufgenommen und sofort mit festem $KHCO_3$ auf pH = 7 gebracht. Das entsprechende Acylanhydrid wurde im Überschuß zur CoA-SH-Lösung zugegeben. Die Lösung, bzw. bei wasserunlöslichen Anhydriden die Suspension, wurde solange geschüttelt, bis mit DTNB keine Reaktion mehr auf freie SH Gruppen erfolgte. Danach wurde der pH-Wert mit HCl auf ~4 eingestellt, um dann das überschüssige Anhydrid sowie die entstandene freie Säure mit Äther auszuschütteln (0° C, viermal mit 10fachem Volumen an Äther).
Nachdem der pH-Wert in den Lösungen mit festem $KHCO_3$ auf pH = 6 erhöht worden war, wurden die Substanzen in kleinen Portionen eingefroren.

8.3 Darstellung von CoAS-SCoA

10 mg CoA-SH wurden in 0,5 ml 10 mM $NaHCO_3$-Lösung (0° C) aufgenommen und durch Zusatz von 0,01 ml einer alkoholischen Jodlösung oxydiert. Durch

---

(*) Die Darstellung von Acetyl~S-Pantethein und S-Acetyl-3'Dephospho-CoA erfolgte analog dieser Vorschrift.

dreimaliges Ausschütteln mit je 5 ml Äther (0° C) wurde die Lösung vom Jod befreit. Die neutrale Lösung wurde im Test eingesetzt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch alkalische Spaltung mit DTNB (s. SH-Gruppenbestimmung II. 13).

9. Konzentrationsbestimmung von CoA-SH und den Derivaten

9. 1 Coenzym A (CoA-SH)

Die Konzentration von CoA-SH wurde im optischen Test mit DTNB bestimmt (ELLMAN, 1959 und ROBYT et al., 1971).
Der Ansatz enthielt

0,95 ml 0,05 M TRIS/HCl-Puffer, pH = 8,0
mit 3,9 mg DTNB/ 100 ml Puffer
0,005 - 0,05 ml CoA-SH-Lösung (0 - ca. 0,08 µmol CoA-SH)
H_2O ad 1 ml

Die Extinktionsänderung sollte dabei unter 1 bleiben.
1 µmol freies CoA-SH ergibt eine Extinktionsänderung bei 412 nm von 11,4 ± 0,6 (ROBYT et al., 1971).
Die Ac~SCoA-Präparationen wurden mit diesem Test auf freies CoA-SH überprüft.

9. 2 Acetyl~SCoA (Ac~SCoA)

Ac~SCoA-Konzentrationen wurden durch die Freisetzung von CoA-SH bei der durch die Citrat-Synthase (E. C. 4. 1. 3. 7) katalysierten Addition von Oxalacetat mit Ac~SCoA im DTNB-Text (9. 1) bestimmt.

Der Testansatz enthielt

0,9 ml 250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 8,0
mit 3,9 mg DTNB / 100 ml Puffer
0,005 - 0,02 ml Ac~SCoA
0,02 ml Citrat-Synthase
0,04 ml 0,01 M Oxalacetat
H_2O ad 1 ml

Die Extinktionsänderung bei 412 nm sollte dabei 1,0 nicht wesentlich überschreiten.

9.3 Bestimmung der Acyl~SCoA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach der verzögerten Nitroproussid-Reaktion nach R.G. BARTSCH (1956).
Der Testansatz (1 ml) enthielt:

0,6 ml gesättigte $(NH_4)_2SO_4$-Lösung
0,1 ml 2 %iges $NaNOFe(CN)_5$
0,1 ml Probe + H_2O
0,1 ml 1,5 M Na_2CO_3
0,067 M NaCN
0,1 ml $NH_4OH_{konz.}$

Die Lösungen wurden in der angegebenen Reihenfolge in eine 1 ml Küvette pipettiert. Der Testansatz wurde nach jeder Zugabe gut durchgemischt.
Die Konzentrationsbestimmung beruhte auf der Bildung eines farbigen Komplexes aus Nitroproussid und der durch Hydrolyse entstehenden SH-Gruppe. Die Bildung des Komplexes wurde bei 520 nm mit Hilfe eines registrierenden Photometers verfolgt. Als Vergleichswert diente dabei ein Ansatz ohne Thioester.
Da die für die einzelnen Ester unterschiedlich schnelle Hydrolyse langsamer

erfolgte als die Reaktion zwischen dem Nitroproussid und den entstehenden SH-Gruppen, der farbige Komplex aber wiederum sehr schnell in farblose Produkte zerfiel, mußten die Maxima der Extinktionsänderungen bestimmt werden. Für die schneller hydrolysierenden Ester (2 - 3 Minuten) wurde Acetyl~SCoA und für die langsamer hydrolysierenden (ca. 4 Minuten) N-Acetyl-S-Acetacetylcysteamin als Eichsubstanz verwendet. Die Konzentration von Acetyl~SCoA wurde im optischen Test mit Citratsynthase (II. 9. 2) bestimmt, die von N-Acetyl-S-Acetacetylcysteamin wurde auf die Einwaage bezogen.

Die folgenden Thioester-Verbindungen wurden getestet:

Thioester	Auftreten des Maximums nach min	Farbe	Eichsubstanz
Acetyl~SCoA	1 - 2	lilarot	-
Propionyl~SCoA	1 - 2	"	Acetyl~SCoA
Butyryl~SCoA	1 - 2	"	"
Valeryl~SCoA	1 - 2	"	"
Malonyl~SCoA	1 - 2	"	"
S-Acetyl-Dephospho-CoA	1 - 2	hellrot	"
Acetacetyl~SCoA	1 - 2	lilarot	"
N-Acetyl-S-Acetacetylcysteamin	3	orange	-
Crotonyl~SCoA	4	rot	N-Ac-S-Acetacetylcysteamin
ß-OH-Butyryl~SCoA	4	rot-orange	"
Palmityl~SCoA	4	rot	"
Acetyl-Pantethein	3	rot	"

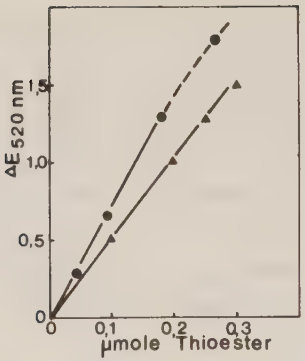


Abb. 11 Eichkurven zur Bestimmung von Thioestern nach der "verzögerten Nitroproussidmethode"

—●— Acetyl~SCoA
—▲— N-Acetyl-S-Acetacetylcysteamin

10. Anreicherung der IPM-Synthase

10. 1 Erste und zweite Ammoniumsulfatfraktionierung

Zur ersten Ammoniumsulfatfällung wurde der Rohextrakt sofort nach der Zentrifugation eingesetzt. Gepulvertes Ammoniumsulfat wurde verhältnismäßig schnell, aber möglichst fein verteilt und unter Vermeidung von Schaumbildung durch das Rühren bei 0° C in den Extrakt (ca. 20 mg Protein/ml) eingestreut. Nach anschließendem Rühren (10 min) wurde bei 0 - 4° C 10 min bei 20 000 g zentrifugiert (Phywe P 15 K, Göttingen). Das Präzipitat der Fällung von 35 - 65 %iger Sättigung wurde in 50 mM Phosphatpuffer (+ 2 mM α-Ketobuttersäure) aufgenommen. Betrug das Volumen der Lösung mehr als 30 ml, so wurde trockenes Sephadex G 25 coarse eingerührt und die Suspension auf eine Sephadex G 25 Säule aufgebracht; anschließend wurde das Protein eluiert. Durch diese Maßnahme war die Lösung weitgehend von $(NH_4)_2SO_4$ befreit und auf ein Volumen unter 30 ml eingeengt. Die Sephadex G 25 Säule war mit 100 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer (pH = 7,5), 5 mM L-Valin,

2 mM α-Ketobuttersäure und 100 mM KCl äquilibriert.

Die zweite Ammoniumsulfatfraktionierung erfolgte nach der Gelfiltration auf Sephadex G 150 in Gegenwart von 2,5 mM L-Leucin und bei RT. Dabei wurde durch Zutropfen von NH_4OH der pH-Wert zwischen 7,2 und 7,4 gehalten. Die Proteinkonzentration für die zweite Fällung betrug 6 - 8 mg/ml. Nach dem Einstreuen des gepulverten $(NH_4)_2SO_4$ wurde 30 min lang gerührt. Das ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert (10 min mit 10 000 g bei 20° C). Die IPM-Synthase präzipitierte im Bereich 45 - 65 %iger Sättigung, wobei sich die Sättigungskonzentration auf eine Lösung von 0° C bezieht.

10.2 Gelfiltration

10.2.1 Gelfiltration mit Sephadex G 25

Die Gelfiltration an Sephadex G 25 fine diente der Entfernung von Salzen und niedermolekularen Substanzen und wurde zum Umpuffern von Extrakten vor den einzelnen Chromatographieschritten verwendet (s. METHODEN 5.5).

10.2.2 Gelfiltration mit Sephadex G 150 (bei 0 - 4° C)

Die Proteinlösung (maximal 30 ml) wurde sofort nach der Abtrennung des $(NH_4)_2SO_4$ mit Hilfe eines Flow-Adapters (Pharmacia, Schweden) auf eine Säule mit 5 cm ⌀ und 140 cm Länge aufgebracht; das Gel war mit 100 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer, 5 mM L-Valin und 4 mM α-Ketobuttersäure äquilibriert. Bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 35 - 40 ml/h wurden Fraktionen von 15 - 18 ml gesammelt; die Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden vereinigt (s. Elutionsdiagramm). Verwendet wurde ein LKB-Fraktionssammler mit Durchflußphotometer und Fallbügelschreiber (Radirac mit Uvicord I, Bromma, Schweden).

10. 2. 3 Gelfiltration mit Sephadex G 200 (bei 23° C)

Das Eluat der DEAE-Cellulose-Säule wurde mit Aquazid I eingeengt und mit Hilfe eines Flow-Adapters auf eine Säule Sephadex G 200 superfine mit 2,5 cm ⌀ und 100 cm Länge aufgebracht. Die Elution erfolgte mit einem Arbeitsdruck von 20 cm, das Fraktionsvolumen betrug ca. 3 ml (50 Tropfen). Der 50 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer (pH = 8,0) enthielt 100 mM KCl, 0,05 % NaN_3 und 0,2 mM KIV. Hier wie bei der Ionenaustauscherchromatographie (II. 10. 3) wurde ein Fraktionssammler mit Durchflußphotometer und Fallbügelschreiber verwendet (LKB 7 000 Ultro-Rac mit Uvicord II, Durchflußzelle V = 0,3 ml; Bromma, Schweden).
Die Proteinkonzentration mußte bei diesem Lauf auf Grund der geringen Extinktionsänderung im Photometer (Zeiss PM Q II, Quarzküvetten QS) bei 1 cm Schichtdicke nachbestimmt werden.

Gelfiltration für MG-Bestimmung s. II. 12. 1.

10. 3 Säulenchromatographie an Ionenaustauschern

10. 3. 1 DEAE-Sephadex A 50 (bei 23° C)

Zur Chromatographie an DEAE-Sephadex A 50 wurden $(K,H)_3PO_4$-Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten und verschiedenen Zusätzen verwendet. Die Säulenabmessungen betrugen 2,5 cm ⌀ und ca. 40 bzw. 30 cm Länge. Das Gel wurde vorher mit dem jeweiligen Puffersystem ausreichend äquilibriert. Nach dem Aufbringen der Proteinlösung wurde mit 20 - 25 ml Puffer nachgewaschen. Anschließend erfolgte die Elution mit einem linearen Salzgradienten. Der Arbeitsdruck betrug ca. 50 cm. Es wurden ca. 6 ml Fraktionen gesammelt. Zur Fraktionierung diente das gleiche System wie unter II. 10. 2. 3

L-Leucin-äquilibrierte Säule

Die Säule wurde mit 50 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 7,2, 0,05 M KCl, 0,05 % NaN_3 und 2,5 mM L-Leucin äquilibriert. Die Elution erfolgte durch einen linearen KCl-Gradienten von 0,1 M KCl bis 0,2 M KCl in obigem Puffer. Das Volumen betrug 2 x 1 l.

L-Valin-äquilibrierte Säule

Die Säule wurde mit 50 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 7,8, 0,05 M KCl, 0,05 % NaN_3 und 4 mM L-Valin äquilibriert. Die Elution erfolgte mit einem linearen KCl-Gradienten von 0,1 M KCl bis 0,25 M KCl in obigem Puffer bei einem Volumen von 2 x 750 ml.

10.3.2 DEAE-Cellulose

Die Säulenchromatographie an DEAE-Cellulose wurde im Prinzip wie die an DEAE-Sephadex durchgeführt. Das Gelbett betrug 2,5 cm ⌀ x 35 cm Länge, der Arbeitsdruck ca. 70 cm. Zur Äquilibrierung wurde 50 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 7,5, 0,02 M KCl und 2,5 mM L-Leucin verwendet.
Die Elution erfolgte mit einem linearen KCl-Gradienten in obigem Puffer aus 500 ml mit 0,05 M KCl und 500 ml mit 0,15 M KCl.

10.4 Konzentrierung von Proteinlösungen

Neben den Ammoniumsulfatfraktionierungen wurden zwei weitere Methoden zur Konzentrierung von verdünnten Proteinlösungen angewendet.

10.4.1 Ultrafiltration in Diaflo-Kammern

Es wurden Diaflo-Kammern (Fa. Amicon N.V., Den Haag, Holland; Modelle 12, 52, 202, 402) für 10, 50, 200 und 400 ml verwendet, dazu die Filter UM 20 E. Der Arbeitsdruck betrug zwischen 0,5 und 5 atü. Die Rührung war so eingestellt, daß eine maximale Durchmischung, aber keine Schaumbildung erfolgte. Die Druckentlastung nach der Einengung erfolgte stets sehr langsam.
Die Methode war auf Lösungen mit stark angereichertem Enzym nicht anwendbar.

10.4.2 Aquazid I (für angereicherte Extrakte)

Die Enzymlösung wurde in einen Dialyseschlauch (Union Carbide Corporation, Chicago; 8 x 100 FT) gefüllt; dieser wurde in Aquazid I-Pulver gelegt. Die Lösung wurde mittels einer elektrisch betriebenen Wippe (K.M. Müller, Hann. Münden) in Bewegung gehalten, um eine Adsorption am Dialyseschlauch zu vermeiden.

11. Gelelektrophoretische Methoden

11.1 Analytische Disk-Gelelektrophorese

Zur analytischen Disk-Gelelektrophorese wurde die Trennkammer der Wiss.-Techn. Werkstätten, Weilheim, EEP 100 mit einer Kapazität von 6 Röhrchen (Plexiglas, 0,7 cm Innendurchmesser, 13 cm Länge) verwendet. Das Untergel betrug 3,5 - 3,8 ml, das Obergel 0,3 ml.
Die Kühlung der Kammer erfolgte mit Leitungswasser. Der Elektrophoresepuffer wurde mit Hilfe einer Pumpe (Typ 101, 40, Fa. Heidolph, Kehlheim) umgewälzt. Als Netzgerät diente das Modell G T 500 der Wiss.-Techn. Werk-

stätten, Weilheim.

Außerdem wurde die Trennkammer von Shandon für 8 Glasröhrchen mit 0,5 cm Innendurchmesser und 7,5 cm Länge verwendet. Die Kühlung erfolgte durch ein Eisbad. Der Elektrophoresepuffer zirkulierte nicht. Das Netzgerät (Modell Vokam SAE 2761, 0-400 V) stammte von Shandon.

Zur Trennung von Proteinen wurden folgende Systeme verwendet:

System A: 7 %, pH = 8,9, nach DAVIS (1964)

Bestandteile pro 100 ml wässriger Lösung:

a)	1 N HCl	48,0 ml
	TRIS	36,3 g
	TEMED	0,23 ml
	pH = 8,9	
b)	Acrylamid	28,0 g
	BIS	0,735 g
c)	Ammoniumperoxydisulfat	0,14 g
d)	1 N HCl	48,0 ml
	TRIS	5,98 g
	TEMED	0,46 ml
	pH = 6,7	
e)	Acrylamid	10,0 g
	BIS	2,5 g
f)	Riboflavin	4,0 g
g)	Saccharose	40,0 g

Oberes (Sammel-)Gel:	Unteres (Trenn-)Gel:
1 Teil d)	1 Teil a)
2 Teile e)	2 Teile b)
1 Teil f)	1 Teil H_2O
4 Teile g)	4 Teile c)

Elektrophoresepuffer:

TRIS	0,6 g
Glycin	2,88 g
H_2O ad	1 l
pH = 8,3	

System B: 7,5 %, pH = 7,5, bzw. 5 %, pH = 7,5, nach WILLIAMS und REISFELD (1964)

Bestandteile pro 100 ml wässriger Lösung:

a) 1 N HCl	48,0 ml
TRIS	6,85 g
TEMED	0,46 ml
pH = 7,5	
b) Acrylamid	30,0 g (20 g)
BIS	0,8 g (0,475 g)
c) Ammoniumperoxydisulfat	0,28 g
d) 1 M H_3PO_4	39,0 ml
TRIS	4,95 g
TEMED	0,46 ml
pH = 5,5	

e), f), g) wie unter System A

Oberes (Sammel-)Gel:	Unteres (Trenn-)Gel:
1 Teil d)	1 Teil a)
2 Teile e)	2 Teile b)
1 Teil f)	3 Teile H_2O
4 Teile g)	2 Teile c)

Elektrophoresepuffer:

Diäthylbarbitursäure	5,52 g
TRIS	1 g
H_2O ad 1 l	
pH = 7,0	

Aufgetragen wurden 20 - 100 µg Protein in 20 - 100 µl. Die Proteinproben wurden mit 1/4 des Volumens mit 40 %iger Saccharoselösung versetzt, um ein gutes Unterschichten zu gewährleisten. Die Elektrophorese erfolgte mit 2 - 3 mA/Röhrchen.

11.2 Proteinfärbung

Die unspezifische Proteinanfärbung erfolgte

1. durch 30 min lange Inkubation in einer Lösung von 10 % Amidoschwarz 10 B in 7 %iger Essigsäure. Entfärbt wurde in 7 %iger Essigsäure bei 90° C über 14 h oder elektrophoretisch in der Entfärbungskammer von Shandon innerhalb von 30 min.
2. durch 5stündige Inkubation unter Rühren in einer 0,025 %igen Coomassie-Brilliant-Blue-R-250-Lösung in

   60 g TES
   800 ml H_2O
   200 ml Methanol
   70 ml Eisessig.

Die Entfärbung erfolgte in einer Lösung aus

120 ml Methanol techn.

380 ml H_2O

20 ml Eisessig bei mehrmaligem Wechsel des Bades.

(HAYES und WELLNER, 1969)

11.3 Präparative Gelelektrophorese

Die präparative Gelelektrophorese erfolgte in Kammern nach STEGEMANN (K.H. Müller, Hann. Münden). Die Geldicke betrug 0,6 cm, 1 cm oder 1,6 cm. Als Spannungsquelle diente ein Spannungskonstanthalter der Fa. Heathkit, Sprendlingen b. Frankfurt/Main; Modell IP-17. Die Stromstärke betrug bei 0,6 cm Geldicke 20 - 30 mA, bei 1 cm 40 - 50 mA und bei 1,6 cm 60 - 70 mA, wobei die Leistung von 70 Watt nicht überschritten wurde. Die Elektrophoresedauer lag zwischen 16 und 40 h, je nach der angelegten Stromstärke und der gewünschten Wanderungsstrecke des zu isolierenden Proteins. Zur Markierung der Wanderungsgeschwindigkeit und zur Kontrolle einer gleichmäßigen Wanderung im Gel diente ein Zusatz von Bromphenolblau zur Proteinlösung.

Zur Formung eines Aufgabetroges im Gel wurde nach Angaben von WOLF (Inst. f. Pflanzenpathologie, Univ. Gött.) ein polierter Plexiglasstab in gewünschter Stärke im Gel mit einpolymerisiert. Der Stab wurde vor der Proteinauftragung vorsichtig entfernt.

Zur Kontrolle und Reinigung des Gels von restlichem Ammoniumperoxydisulfat erfolgte vor der präparativen Auftrennung eine Probeelektrophorese mit Bromphenolblau (2 - 6 h).

Die Kühlung erfolgte mit Hilfe eines Kryomaten; die Temperatur der Kühlflüssigkeit betrug 5 - 8° C, die Temperatur im Gel 15 - 20° C.

Als Elektrophoresesysteme dienten die der analytischen Disk-Gelelektrophorese, aber ohne Obergel. Die analytisch erhaltenen Ergebnisse konnten direkt auf die präparative Anordnung übertragen werden.

Die Elution des Enzyms erfolgte durch Rühren (30 min) der zerkleinerten Gelstücke in 250 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 7,5, mit 0,5 mM KIV (und z.T. mit 2,5 mM L-Leucin). Zur Zerkleinerung der das Enzym enthaltenen Gelstücke wurden diese in eine 25 ml Glasspritze ohne Kanüle gegeben und in obigen Puffer hineingedrückt. Die Gelpartikel wurden durch Zentrifugation (20 min, 20 000 g, 20° C) und vorsichtiges Dekantieren des Überstandes abgetrennt und in neuen Puffer gegeben. Zur quantitativen Elution erfolgte dies 4 - 5 mal, wobei zum Schluß längere Elutionszeiten angewendet wurden.

11.4 Nachweis der IPM-Synthase im Gel

Zum spezifischen Nachweis der IPM-Synthase im Gel wurde der DTNB-Test (s. II.7.3) mit erhöhten Substrat-Konzentrationen (KIV = 3,75 mM, Ac~SCoA = 1,5 mM) verwendet. Die analytischen Gelröhrchen wurden in 1 ml Testansatz inkubiert, bei beginnender Ausbildung der gelben Zonen wurden diese durch feine Drähte markiert.
Bei der präparativen Gelelektrophorese konnte die Lage der Banden nicht auf dem gesamten Gelblock nachgewiesen werden, da beim Test freies CoA-SH entsteht, das die IPM-Synthase inaktivierte. Daher wurden vom Gelblock schmale Streifen (je einer vom Rand und einer aus der Mitte) abgeschnitten; diese wurden mit 1,25 M Phosphatpuffer, pH = 8,0, bei 40° C innerhalb von 10 min oberflächlich umgepuffert und mit der Testlösung inkubiert.
Nach der Lage der Banden auf den Streifen wurden aus dem Gelblock die Enzym enthaltenden Zonen ausgeschnitten.

11.5 Bestimmung des Isoelektrischen Punktes

(verändert nach WRIGLEY, 1968; sowie LKB-Vorschrift für Ampholin)

Die Bestimmung des Isoelektrischen Punktes mit Hilfe von Ampholyten erfolgte

in der Anordnung zur analytischen Gelelektrophorese. Dazu wurden Glasröhrchen von 0,5 cm ϕ und 10 cm Länge verwendet.

Das Gel wurde aus folgenden Lösungen hergestellt:

a) 24 g Acrylamid
0,64 g BIS
H_2O ad 100 ml

b) 1 ml TEMED auf 100 ml H_2O

c) 50 mg Ammoniumperoxydisulfat auf 164 ml H_2O

d) Ampholin (original nach LKB)

Für 6 Röhrchen wurden benötigt:

3 ml a)
0,8 ml b)
8,2 ml c)
0,3 ml d).

Die Mischung wurde ca. 1 min evakuiert, dann in die mit Chromschwefelsäure gereinigten Glasröhrchen ca. 8 cm hoch eingefüllt und sofort mit H_2O überschichtet. Nach dem Polymerisieren wurden die Röhrchen mit H_2O ausgespült und in die Elektrodenkammer eingesetzt.

Das Gel wurde mit 200 µl Ampholinlösung (0,5 ml Ampholinlösung in 20 ml 5 %iger Sucrose) überschichtet.

Die gegen 5 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 7,5 dialysierte Proteinlösung (ca. 50 µl, 10 %ig an Sucrose) wurde unterschichtet. Anschließend wurden die Röhrchen mit 0,1 %iger Phosphorsäure aufgefüllt.

Die untere Kammer (Kathode) wurde mit 0,1 %igem Äthanolamin, das mit einigen Tropfen einer 0,2 %igen Lösung von Methylrot angefärbt war, gefüllt. In die obere Kammer wurde 0,1 %ige Phosphorsäure gegeben.

Die Fokussierung erfolgte mit 100 Volt bei 1 mA pro Röhrchen für 1 h und anschließend mit 200 Volt. Das Ende der Fokussierung wurde durch das Abfallen des Stromes auf ganz geringe mA-Werte und durch die Bildung eines scharfen roten Ringes von Methylrot angezeigt.

Die Fokussierung erfolgte parallel mit Ampholinlösungen für den Bereich pH = 3 - 10 und pH = 3 - 6.

Nach Beendigung der Fokussierung wurden die Röhrchen verschiedenen Bedingungen unterworfen:

a) Die Geloberfläche wurde mit 1,25 M $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 8,2 10 - 15 min umgepuffert. Anschließend wurden die Gele in einen DTNB-Testansatz zur spezifischen Markierung der IPM-Synthase (II. 11. 4) überführt.

b) Entsprechend der spezifischen Anfärbung wurden die Gele in dünne Scheiben (~ 1 mm) geschnitten; jede wurde in 0,5 ml H_2O bidest. zerdrückt. Nach 30 min wurden die IPM-Synthase-Aktivität und der pH-Wert der einzelnen Lösungen geprüft. Nach einer Verdünnung von 1 : 200 wurde der pH-Wert der Lösungen erneut bestimmt, um einen Verdünnungseffekt bei der pH-Messung zu berücksichtigen.

c) In einigen Gelen wurde das Protein mit Coomassie Blue nach folgender Vorschrift (HAYES et al., 1969) angefärbt:

Fixieren:	1 h in 5 % TES / 5 % Sulfosalicylsäure
Waschen:	1 h in H_2O bei mehrfachem Wechseln und Rühren
Färben:	3 - 4 h in 0,066 % Coomassie blue in 0,2 M TRIS/HCl-Puffer, pH = 7,7
Entfärben:	24 - 28 h in 0,1 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 7,7

11.6 SDS-Gelelektrophorese

Das Enzym von der Sephadex G 200 Säule (ca. 200 µg) wurde mit Aquazid I eingeengt und mit 2 %iger SDS-Lösung zu gleichen Teilen versetzt, sowie mit 5 µl Mercaptoäthanol / 50 µl Proteinlösung. Nach 6 h Reaktionszeit wurde gegen eine 0,1 %ige SDS-Lösung in 25 mM $(Na,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 7,1 15 h lang dialysiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in der Kammer nach Stegemann bei 3 mm Geldicke aus 7,5 g Acrylamid, 0,2 g BIS und 150 ml 0,025 M $(Na,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 7,1 mit 0,1 % SDS. Zur Auftragung der Probe sowie der Referenzproteine Cytochrom c, Chymotryp-

siogen A, Albumin aus Hühnerei und Rinderserumalbumin für die Molekulargewichtsbestimmung war ein Trogformer mit einpolymerisiert worden. Die Proben (50 - 100 µl), mit Bromphenolblau versetzt, wurden jeweils getrennt in eine Geltasche gegeben. Die Elektrophoresedauer betrug bei 200 V und 80 mA ca. 3 h. Die Proteinanfärbung erfolgte wie unter II. 11. 2 beschrieben mit Coomassie Blue R 250 in einer flachen Schale.

12. Bestimmung von SH-Gruppen und Disulfidbrücken
(Nach ROBYT et al., 1971)

Hochangereichertes Enzym von der Sephadex G 200 Säule wurde mit Aquazid I stark eingeengt und gegen 20 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 7,5, 12 h dialysiert. Zu 0,5 ml Proteinlösung (= 0,92 mg Protein) wurden 0,1 ml 1,25 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 8,1, zugegeben. Zu dieser Lösung sowie zur Referenzprobe ohne Protein wurden mehrmals in Abständen von ca. 5 min 10 µl DTNB-Lösung (10 mM) zugegeben und die Extinktionsänderungen bei 412 nm bestimmt.
Nach ca. 45 min war keine Extinktionsänderung (bei insgesamt 1 mM DTNB) aufgetreten, d. h. im Enzym sind keine freien SH-Gruppen vorhanden.

Der Probe und der Referenzlösung wurden je 5 µl einer 1 mM 2-Mercaptoäthanol-Lösung zugefügt. Nach 30 min wurde die Extinktion bestimmt und anschließend der pH-Wert mit NaOH auf pH = 10,5 eingestellt. Nach 2 min wurde der pH-Wert wieder auf 8,1 gesenkt und erneut die Extinktion bei 412 nm abgelesen. In Vorversuchen war die ungefähr benötigte Menge an Lauge und Säure bestimmt worden, so daß die pH-Änderungen innerhalb von 30 sec erfolgten. Die pH-Messung wurde mit einer feinen Elektrode (Eichlösungen von Wiss.-Techn. Werkstätten GmbH, Weilheim OBB.) durchgeführt. Man erhält pro Mol Disulfidbrücke zwei Mole Carboxynitrothiophenolat (CNT); die Anzahl (n) der Disulfidbrücken läßt sich folgendermaßen bestimmen:

n = Anzahl der CNT in der Proteinprobe (nach pH = 10,5)
- Anzahl der CNT in der Referenzprobe (nach pH = 10,5)
: 2

Sind freie SH-Gruppen im Protein vorhanden, so müssen diese ebenfalls abgezogen werden.

13. Molekulargewichtsbestimmung

13.1 Gelfiltration auf Sephadex G 200 superfine
(Nach ANDREWS, 1962)

Eine Säule mit einem Gelbett von 1,5 cm ⌀ und 62 cm Länge aus Sephadex G 200 superfine wurde gegen 50 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer mit 200 mM KCl und 0,1 mM KIV bzw. gegen 50 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer mit 10 mM KCl und 2,5 mM L-Leucin äquilibriert. Als Referenzproteine wurden Katalase, Aldolase, Rinderserumalbumin und Albumin aus Hühnerei (Boehringer, Combithek) verwendet.
Die Referenzproteine wurden in der IPM-Synthase-Lösung gelöst (ca. 0,2 ml Volumen) und gemeinsam über den Flow-Adapter aufgegeben. Die Elution erfolgte mit dem gleichen Puffersystem, mit dem äquilibriert worden war.
Die Fraktionierung in 15 Tropfen erfolgte wie unter II.5.5 beschrieben. Da auf Grund des unterschiedlichen Proteingehaltes die Tropfengröße schwankte, mußte das Volumen (0,6 - 0,8 ml) für den Fraktionierungsbereich nachbestimmt werden.
Die Verteilung der Proteine in den Fraktionen wurde entweder durch Messung der Enzymaktivität (IPM-Synthase, Aldolase, Katalase) oder durch Messung der Absorption (Dextranblau $\Delta E_{600\ nm}$, Albumine ΔE_{280nm}) bestimmt.

13.2 Zentrifugation im Saccharose-Gradienten

Die Bestimmung erfolgte über die Sedimentationskonstante (nach MARTIN und AMES, 1961; OEDING, 1972).

Die Gradienten wurden mit Hilfe eines Zwei-Kammer-Mischgefäßes aus 6 %iger und 30 %iger Saccharose (je 2,7 ml) hergestellt. Das Füllen der Zentrifugenbecher (Zellulose-Nitrat-Zentrifugenröhrchen, Beckmann) erfolgte mittels einer Kapillare, so daß der Auslauf sich stets in der Höhe des Meniskus des Gradienten befand.
Um geringe Unregelmäßigkeiten im Gradienten durch Diffusion auszugleichen, wurden die gefüllten Zentrifugenbecher 4 - 5 h bei 4° C gehalten.
Die Enzymlösung (0,1 ml) mit den Referenzproteinen Katalase und Aldolase wurde direkt vor der Zentrifugation auf den Gradienten aufgegeben.
Die Zentrifugation erfolgte in einer Christ-Ultrazentrifuge (Heraeus-Christ, Osterode, Modell Omega II, 70 000) bei 5° C und einer mittleren Drehzahl von 38 800 U/min, entsprechend einer Winkelgeschwindigkeit von 4 063 rad/sec. Der 3 x 5 ml-Rotor (Aluminium, Höchstdrehzahl 40 000 U/min) hatte folgende Geometrie: Becherboden-Rotorachse: 9,8 cm; Meniskus-Rotorachse: 5,02 cm. Die Zentrifugationsdauer betrug 17 h.
Zur Fraktionierung des Gradienten wurden die Zentrifugenbecher mit einer Hohlnadel angestochen und Proben zu 4 Tropfen entnommen. Nach dem Durchmischen der Fraktionen wurden die Enzymaktivitäten in den optischen Tests bestimmt; die Linearität des Saccharose-Gradienten wurde refraktrometrisch überprüft (Abbé-Refraktrometer, Zeiss-Jena, Modell G; mit einer Na-Dampf-Lampe bei 25° C).

Chemikalien

Es wurden die handelsüblichen p.a. Chemikalien der Fa. MERCK, Darmstadt, der Fa. FLUKA/FLUKA-SCHUCHARDT, sowie die Biochemikalien der Fa. C.F. BOEHRINGER und Söhne, Mannheim, verwendet.
Außerdem wurden bezogen:
KIV, PMSF, Thiaminpyrophosphat und Pantethine(S-S) von der Fa. SIGMA Chem. Comp., St. Louis, USA;
Aquazid I von der Fa. CALBIOCHEM. Inc., Los Angeles, USA;
Malonyl-SCoA, Palmityl-SCoA, Dowex-Austauscher und DTNB von der Fa. SERVA Entwicklungslabor, Heidelberg;
NMG von der Fa. L. LIGHTS & Co. Ltd., Colnbrook, England;
Nutrient-Broth und Agar von der Fa. DIFCO Laboratories Detroit, USA;
die Säulenmaterialien von der Fa. W. u. R. BALSTON Ltd., Maidstone, England (Whatman DE 52, CM 32), PHARMACIA, Uppsala Schweden (Sephadex-Gele) und von der Fa. BIO-RAD, Richmond, Calif., USA (Hydroxylapatit Bio-Gel HT) D,L-α Isopropyläpfelsäure war dankenswerterweise von Herrn Prof. Dr. W.R. Martin, Chicago, sowie Magneson von Herrn Prof. M. Ziegler, Göttingen, zur Verfügung gestellt.
D,L-5', 5', 5'-Trifluorleucin war eine Sonderanfertigung der Fa. PIERCE Chemical Comp. Rockford, USA.

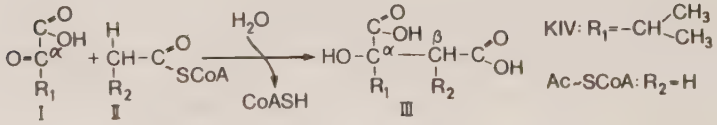
III. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

1. Enzymaktivität der α-Isopropylmalat-Synthase und Regulation durch Repression und Derepression

1.1 Bestimmung der Enzymaktivität

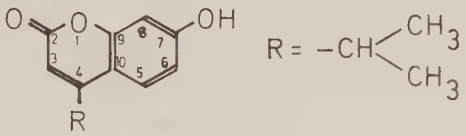
1.1.1 Bestimmung der Aktivität im Fluoreszenztest

Die α-Isopropylmalat-Synthase (IPM-Synthase) katalysiert die nukleophile Addition von Acetyl~SCoA (Ac~SCoA) an α-Ketoisovalerat (KIV) zu α-Isopropylmalat (IPM) unter Freisetzung von reduziertem Coenzym A (CoA-SH) (JUNGWIRTH et al., 1961).



Die sich anbietende Möglichkeit zur Aktivitätsbestimmung der IPM-Synthase (KOHLHAW et al., 1969) durch Messen der Substrat(Ac~SCoA)-Abnahme oder der Produkt(CoA-SH)-Zunahme im optischen Test läßt sich für wenig angereicherte Enzympräparationen nicht verwenden, da das eingesetzte Ac~SCoA in Extrakten von Hydrogenomonas eutropha H 16 - A 81 so schnell durch andere Reaktionen gespalten wird, daß die Additionsreaktion nicht verfolgt werden kann. So wurde ein Test nach Angaben von CALVO et al. (1969) ausgearbeitet und standardisiert. Dieser Test ist eine Endpunktbestimmung des gebildeten Produkts IPM und beruht auf dessen Decarboxylie-

rung, der Oxydation der α-Hydroxygruppe mit konzentrierter Schwefelsäure bei 60° C zu ß-Ketoisocapronsäure und der weiteren Umsetzung mit Resorcin zu 4-Isopropylumbelliferon.



Letzteres kann durch eine fluorimetrische Messung im alkalischen Puffer quantitativ bestimmt werden.

Unter den angewandten Bedingungen besteht zwischen 0 und 1000 µg eingesetzter - synthetisch hergestellter - IPM und der gemessenen Fluoreszens eine lineare Abhängigkeit (s. Methoden). Die Fehlerbreite im Test liegt bei ± 3 % und ist in erster Linie durch eine Ätherextraktion bedingt. Der enzymatische Test verläuft im pH-Bereich von pH = 7,3 bis pH = 8,0 über 50 min linear (Abb. 1). Bei höheren pH-Werten sowie bei längeren Zeiten erhält man zu niedrige Werte.

Für Rohextrakte aus H. eutropha, die durch Gelfiltration mit Sephadex G 25 von niedermolekularen Effektoren gereinigt wurden, besteht mindestens bis zu 1,5 mg Protein (bei einer Testdauer von 20 min) eine Proportionalität zwischen eingesetzter Proteinmenge und dem gebildeten Produkt (Abb. 2). Bei Weglassen einzelner Komponenten des Testansatzes erhält man kaum meßbare Mengen an IPM (Tab. 1).

Die eigentlichen Nachteile dieses Tests bestehen in dem großen Arbeits- und Zeitaufwand. Für eine Aktivitätsbestimmung benötigt man 50 - 60 min. Der Vorteil des Tests liegt in seiner Spezifität. Je 1,5 mole der Hydroxysäuren Glycolsäure, Citronensäure, Milchsäure, Weinsäure, Äpfelsäure stören den Test nicht nennenswert.

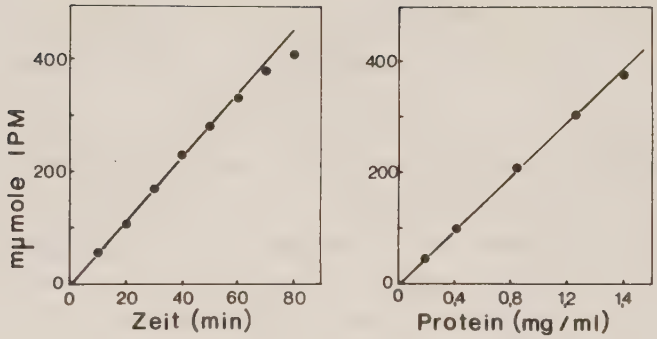


Abb. 1 Proportionalität der Inkubationszeit zur Aktivität der IPM-Synthase im fluorimetrischen Test

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte in 250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 7,8. Die eingesetzte Proteinmenge betrug 0,42 mg.

Abb. 2 Proportionalität der eingesetzten Proteinmenge zur Aktivität der IPM-Synthase im fluorimetrischen Test

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte in 250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 7,8. Die Inkubationsdauer betrug 20 min.

Tab. 1 Die Verringerung der IPM-Synthase-Bildung durch Weglassen einzelner Komponenten des Testansatzes

Ansatz	Fluoreszens-einheiten	mμmole gebildete IPM	% des kompletten Tests
komplett	285	1 620	100
ohne Extrakt	5	0	0
ohne KIV	8	17	1,05
ohne Coenzym A	6	0	0
ohne Acetylphosphat	6	0	0
ohne Phosphotransacetylase	11	43	2,6
komplett, t = 0	6	0	0

Das Testgemisch hatte die unter METHODEN aufgeführte Zusammensetzung. Einzelne Komponenten wurden wie angegeben weggelassen. Die Ansätze wurden durch Zugabe von 1,4 mg Protein eines Rohextraktes von H. eutropha H 16 - iv^{-}43 nach Gelfiltration über Sephadex G 25 (für 5 ml ca. 60 ml Gel) gestartet.

1.1.2 Bestimmung der Enzymaktivität durch die optischen Tests bei 232 und 412 nm

Bei der Chromatographie an DEAE Sephadex (s. 3. 8/9) wurde die noch bis dahin vorhandene Thioesteraseaktivität von der IPM-Synthaseaktivität abgetrennt. Dadurch konnte letztere in den so gereinigten Extrakten im optischen Test durch Verfolgen des Auftretens des Produktes CoA-SH bestimmt werden.

Der Aktivitätsmessung im optischen Test bei 232 nm (OCHOA, 1955) liegt die unterschiedliche Absorption von dem Substrat Ac~SCoA und dem Produkt

CoA-SH zugrunde. Der molare Extinktionskoeffizient beträgt - 5,400 $cm^2/\mu mol$.

Läßt man bei einem pH-Wert von pH = 8,0 oder höher die freie SH-Gruppe des Coenzyms A mit 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoat)(DTNB) zum gemischten Disulfid und dem farbigen 3-Carboxy-4-nitrothiophenolat(CNT) (E_{max} 412 nm) reagieren, so wird der optische Test sehr viel empfindlicher; der Extinktionskoeffizient beträgt nun 13,6 $cm^2/\mu mol$ (ELLMAN, 1959) bzw. 11,4 $cm^2/\mu mol$ (ROBYT et al., 1971). Die Reaktion mit DTNB ist aber nur zu verwenden, wenn im katalytischen Zentrum des Enzyms keine SH-Gruppen vorhanden sind bzw. wenn diese durch Effektoren geschützt werden können. Bei der Messung der IPM-Synthase aus H. eutropha H 16 - A 81 konnte der Test mit DTNB verwendet werden, sofern er nicht, wie sonst üblich, mit dem Substrat KIV sondern mit dem Enzym gestartet wurde. Aber ebenso mußte der optische Test bei 232 nm mit dem Enzym gestartet werden, anderenfalls gab es auch hier geringere Anfangsaktivitäten. Dieser Effekt kann auf eine Inaktivierung des Enzyms durch Ac~SCoA/CoA-SH in Abwesenheit des anderen Substrates KIV zurückgeführt werden (s. III.4.8.3).

1.2 Vergleich der Enzymaktivitäten

Die Aktivität der IPM-Synthase betrug in Extrakten aus H. eutropha H 16 (A. eutrophus H 16) (ATCC 17699), wenn die Zellen am Ende der logarithmischen Phase geerntet wurden, bei autotropher Anzucht 6,5 E/g Protein, bei heterotropher Anzucht 10 - 12 E/g Protein für 30° C Testtemperatur und 15 - 16 E/g Protein für 37° C Testtemperatur. Diese, für Enzyme der Biosynthese charakteristische, geringe Enzymaktivität war für eine Anreicherung ungünstig. Es wurde daher versucht, durch veränderte Anzuchtbedingungen die IPM-Synthase-Aktivität im Wildtyp zu erhöhen. Gleichzeitig sollte ein Einblick in die Regulation des Enzyms durch Repression und Derepression seiner Synthese gewonnen werden.

1.2.1 Die Enzymaktivität im Verlauf einer Wachstumsperiode

Wie aus Befunden an Salmonella und Micrococcus hervorgeht, ist die spezifische Aktivität der IPM-Synthase während eines Wachstumsverlaufs einer statischen Kultur nicht konstant. KOHLHAW et al. (1969) erhielten im Verlauf einer Wachstumsperiode von S. typhimurium die höchste IPM-Synthase-Aktivität eine Stunde nach Erreichen der stationären Wachstumsphase. Dagegen steigt in M. denitrificans (FISCHER, 1973) die Aktivität der IPM-Synthase während der logarithmischen Phase stark an und erreicht am Ende dieser Phase den relativ höchsten Wert. Mit Beginn der stationären Phase ist die Aktivität aber schon auf 50 % ihres Maximums gesunken. Es sollte nun geprüft werden, ob und wie in H. eutropha H 16 die IPM-Synthase-Aktivität während einer Wachstumsperiode variiert und wann der günstigste Zeitpunkt zum Ernten der Zellen liegt.

Die IPM-Synthase-Aktivität steigt auch in diesem Organismus zu Beginn der logarithmischen Phase an, bleibt dann aber über eine längere Zeit konstant und fällt erst zu Beginn der stationären Phase stark ab (Abb. 3). Daher wurden Wildtypzellen, insbesondere zum Vergleich von Enzymaktivitäten bei unterschiedlichen Anzuchtsbedingungen, nach ca. 12 - 14 h Wachstum am Ende der logarithmischen Phase geerntet.

CALVO und UMBARGER (1963) konnten bei S. typhimurium nachweisen, daß die Bildung der IPM-Synthase durch das Endprodukt L-Leucin gehemmt wird und daß bei Leucinmangel das Enzym dereprimiert gebildet wird. Ein relativer Leucinmangel sollte während der logarithmischen Wachstumsphase eintreten, wenn ständig viele Aminosäuren für die Proteinsynthese benötigt werden. Im Einklang mit dieser Annahme steht die erhöhte Bildung der IPM-Synthase bei M. denitrificans (FISCHER, 1973) und bei H. eutropha H 16 während der logarithmischen Wachstumsphase. Die davon abweichende IPM-Synthase-Bildung in S. typhimurium - das Enzym erreicht erst in der stationären Phase seine höchste Aktivität - führen KOHLHAW et al. (1969) auf eine veränderte Permeabilität der Zellmembran für L-Leucin zurück.

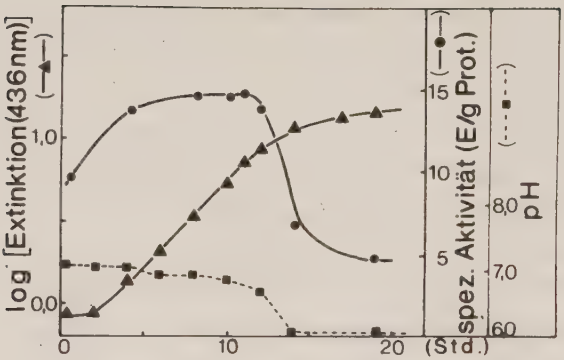


Abb. 3 Die IPM-Synthase-Aktivität im Verlauf einer Wachstumsperiode von H. eutropha H 16 (Wildtyp)

Verwendet wurde ein Brunswick-10 l-Fermenter mit Fructose/Mineralmedium. Die Temperatur betrug 29° C. Die Proben wurden durch Eiszugabe sofort gekühlt; die Zellen wurden bei 0 - 4° C abzentrifugiert. Sie wurden bis zur Aufarbeitung bei - 18° C gelagert. Nach Aufschluß der Zellen in der French-Presse und Zentrifugation (30 min, 25 000 g) wurde die Aktivität im Fluoreszenztest bei 37° C bestimmt.

1.2.2 Vergleich der Enzymaktivität in Gegenwart von Aminosäuren und Ca-Pantothenat

Um zu prüfen, wie weit die Gegenwart von Aminosäuren die Enzymbildung beeinflußt, wurde H. eutropha H 16 unter Zusatz verschiedener Kombinationen von L-Leucin, L-Valin, L-Isoleucin, L-Threonin und Ca-Pantothenat angezogen. Außerdem sollte gleichzeitig geprüft werden, ob zwei verschiedene IPM-Synthasen vorhanden sind und ob sie durch ihre unterschiedliche Repression und Derepression nachgewiesen werden können (s. III. 1.3).

HILL (1968) hatte für H. eutropha H 16 schon wahrscheinlich gemacht, daß die IPM-Synthase einer Endproduktrepression durch 4 mM L-Leucin im Kulturmedium unterliegt. Diese Endproduktrepression wurde auch bei anderen Organismen nachgewiesen (CALVO und UMBARGER, 1963, S. typhimurium; WEBSTER und GROSS, 1965, N. crassa; BAUMGARTEN, 1969, Arthrobacter St. 23; FISCHER, 1973, M. denitrificans).

FISCHER (1973) zeigte auch, daß L-Isoleucin, L-Valin und L-Threonin bei M. dénitrificans keinen Einfluß auf die IPM-Synthase-Bildung haben. Abweichend davon fand SATYANARAYANA et al. (1968), daß das Enzym in Saccharomyces durch L-Threonin und verstärkt durch L-Threonin und L-Leucin reprimiert wird, nicht aber durch L-Leucin allein; sondern 1 mM L-Leucin im Kulturmedium bewirkte eine leichte Derepression der IPM-Synthase.

Zur Repression der Threonin-Desaminase, Acetohydroxysäure-Synthase (AHS-Synthase) und -Dehydratase in S. typhimurium und E. coli ist die gleichzeitige Anwesenheit von L-Isoleucin, L-Valin, L-Leucin und Ca-Pantothenat notwendig ("Multivalente Repression", FREUNDLICH et al., 1962; UMBARGER und FREUNDLICH, 1965).

Für H. eutropha konnte das Ergebnis von HILL (1968) bestätigt werden (Tab. 2, Spalte 2): Durch Anwesenheit von 5 mM L-Leucin im Kulturmedium verringerte sich die IPM-Synthase-Aktivität in H. eutropha H 16 von 16,2 auf 8,8 E/g Protein (Testtemperatur 37° C); das entspricht einer Repression um 50 %.

Außerdem ließ sich zeigen, daß der Zusatz von L-Leucin und L-Isoleucin gemeinsam, sowie der von allen drei Aminosäuren mit und ohne Ca-Pantothenat eine ähnlich starke Repression ergibt. Daraus folgt, daß diese Aminosäuren die Repression durch L-Leucin weder aufheben noch verstärken. Doch L-Valin allein bewirkte ebenfalls eine Aktivitätserniedrigung. Sie könnte darauf zurückzuführen sein, daß genügend KIV in der Zelle zur Verfügung steht, da, zusätzlich zu dem durch die AHS-Synthase gebildeten KIV, aus L-Valin durch die reversible Transaminierungsreaktion KIV ge-

Tab. 2 Der Einfluß verschiedener Aminosäuren im Kulturmedium auf die Bildung der IPM-Synthase

Zusätze zur Mineralnährlösung je 5 mM	Spalte 1 Zellausb. in g NG/l	Spalte 2 IPM-Synthase E/g Protein	Spalte 2 IPM-Synthase % Aktivität	Spalte 3 AHS-Synthase E/g Protein	Spalte 3 AHS-Synthase % Aktivität
-	4,1	16,2	100	57,3	100
L-Leucin	3,8	8,8	54	53	92,5
L-Valin	4	10,8	67	55,4	97
L-Isoleucin	2,7	23	140	59	103
L-Threonin	2,5	4,2	26	33,8	59
L-Isoleucin, L-Leucin	4	9	56	47	82
L-Isoleucin, L-Valin	4,3	73	450	16	28
L-Isoleucin, L-Valin, L-Leucin	4,3	9,3	57	56,8	99
L-Isoleucin, L-Valin, L-Leucin, Ca-Pantothenat (20 mg/l)	3,8	9,1	56	12,2	21,3

Die IPM-Synthase-Aktivität wurde im Fluoreszenstest (s. Methoden) bei pH = 8,2 und 37° C unter Verwendung der Eichkurve 2 bestimmt. Der Test wurde unter Zugabe von jeweils ca. 1 mg Protein eines über Sephadex G 25 (ca. 35 ml Gel für 4 ml Rohextrakt) von niedermolekularen Effektoren gereinigten Rohextraktes gestartet.
Mit je ca. 1 mg des gleichen Extraktes wurde auch die AHS-Synthase-Aktivität bestimmt (Test s. Methoden).

bildet wird. So kann viel L-Leucin entstehen, das dann zur Repression der IPM-Synthase führt. Daß aus L-Valin KIV gebildet werden kann, zeigt das Wachstum einer L-Isoleucin und L-Valin doppelauxotrophen Mutante (H. eutropha H 16 - A 81, wahrscheinlich in der Dihydroxysäuredehydratase blockiert, REH, 1967) allein mit L-Valin und L-Isoleuin; das Wachstum unter

diesen Bedingungen ist nur wenig langsamer als das Wachstum in Gegenwart von L-Isoleucin, L-Valin und zusätzlichem L-Leucin (REH, 1967).
Die Repression von nahezu 75 % durch L-Threonin ist wegen der gleichzeitigen starken Wachstumshemmung (s. Tab. 2, Spalte 1) schlecht zu vergleichen. Man muß annehmen, daß L-Threonin durch seine Regulationswirkung in der Aspartatfamilie wirkt und u. a. einen Mangel an Methionin durch eine Hemmung der Homoserin-Dehydrogenase und damit eine Wachstumshemmung hervorruft, so daß selbst bei geringster Leucinsynthese mehr L-Leucin vorhanden ist, als bei dem verlangsamten Wachstum verbraucht wird.

Erstaunlich ist die starke Derepression der IPM-Synthase, wenn L-Isoleucin und L-Valin gemeinsam im Medium vorhanden sind und die geringere Derepression durch L-Isoleucin allein.
Um festzustellen, ob ein direkter Einfluß der Aminosäuren L-Valin und L-Isoleucin auf die Repression und Derepression der IPM-Synthase vorliegt und nicht nur durch die Beeinflussung der Konzentration des Substrates KIV vorgetäuscht wird, wurden die Aktivität der AHS-Synthase und der Threonin-Desaminase, der regulatorisch wichtigen Enzyme der Isoleucin- und Valinsynthese, zur Beurteilung herangezogen. Die Threonin-Desaminase wird, wenn L-Leucin, L-Valin, L-Isoleucin und Ca-Pantothenat einzeln zum Kulturmedium zugegeben werden,kaum, wenn alle zusammen zugesetzt werden, um ca. 25 % reprimiert (REH, 1967). Diese Schwankung der Threonin-Desaminase dürfte keinen Einfluß auf das Angebot von KIV und somit auf die Synthese von L-Leucin haben.
Die Bildung der AHS-Synthase wird durch die Aminosäuren verschieden beeinflußt (Tab. 2, Spalte 3). L-Isoleucin und L-Valin gemeinsam reprimieren die AHS-Synthase um 78 % und vermindern damit die KIV-Bildung. Dies könnte die starke Derepression der IPM-Synthase in Gegenwart von L-Isoleucin und L-Valin erklären, wenn man annimmt, daß die Transaminierungsreaktion von L-Valin nicht ausreicht, um genügend KIV für die Leucinbiosynthese bereitzustellen. Die Transminierung von L-Valin zu KIV sollte durch den Überschuß an L-Isoleucin verringert werden, da beide Amino-

säuren mit der Transaminase reagieren. Nach den Ergebnissen von HILL (1968) ist die Affinität der Transaminase für L-Valin und L-Isoleucin, bzw. die Umsetzungsgeschwindigkeit der Rückreaktion zu den Ketosäuren, gleich groß.

Die Derepression der IPM-Synthase durch L-Isoleucin allein läßt sich so nicht erklären, da die AHS-Synthase hier nicht reprimiert war. Ein Überschuß an L-Isoleucin könnte zwar einen erhöhten Bedarf an L-Valin und L-Leucin zur Folge haben. Für diesen Fall sollte dann aber die AHS-Synthase stärker dereprimiert sein, als hier gefunden wurde (103 %, bezogen auf die Aktivität bei der Anzucht ohne Aminosäure).

Durch L-Leucin, L-Valin, L-Isoleucin und Ca-Pantothenat wurde die AHS-Synthase auf 21 % der Kontrollaktivität erniedrigt. Diese Repression der AHS-Synthase führte aber zu keiner Derepression der IPM-Synthase, da L-Leucin diese auch hier reprimierte.

Nach den vorliegenden Daten scheint die IPM-Synthase-Bildung direkt nur durch L-Leucin reguliert zu werden. Eine Wirkung von L-Isoleucin ist aber nicht vollständig auszuschließen; insbesondere bei Berücksichtigung der Ergebnisse von BLATT und UMBARGER (1972) und BOLLON und MAGEE (1973), die einen komplexen Repressionsmechanismus für die verzweigten Aminosäuren durch einen zusammengesetzten Repressor aus L-Isoleucyl-tr-RNS und inaktiven Enzymproteinen postulierten.

WASMUTH et al. (1973) zeigten, daß für eine Repression der Isoleucin- und Valin-Biosyntheseenzyme in S. typhimurium und E. coli sowohl freies und aktiviertes L-Isoleucin als auch aktiviertes L-Valin und L-Leucin vorhanden sein müssen. Wieweit diese Vorstellungen für H. eutropha H 16 zutreffen können, läßt sich aus den bisher bekannten Daten nicht beurteilen.

Für die AHS-Synthase läßt sich aus den vorliegenden Ergebnissen nur die alleinige Regulation durch "multivalente Repression" wie bei E. coli und S. typhimurium ausschließen. Die Regulation scheint komplizierter zu sein, da L-Isoleucin und L-Valin gemeinsam zwar reprimieren, dies aber durch

zusätzliches L-Leucin anscheinend aufgehoben wird. Erst die Zugabe von Ca-Pantothenat zu allen drei Aminosäuren ergibt wieder eine Repression. Zur Klärung der Regulation der AHS-Synthase-Bildung in H. eutropha H 16 bedarf es noch weiterer Untersuchungen, insbesondere auch der Klärung, ob verschiedene AHS-Synthasen vorhanden sind (s.III. 1.3).

1.2.3 Vergleich der Enzymaktivität bei Anzucht mit 2-Aminobuttersäure und Citraconsäure

Verschiedene Autoren (HORVATH et al., 1964, P. aeruginosa, E. coli; FREUNDLICH und CLARKE, 1968, E. coli; BAUMGARTEN, 1969, Arthrobacter spec.) hatten nachgewiesen, daß 2-Aminobuttersäure einen Valinmangel hervorruft und eine vorübergehende Wachstumshemmung bewirkt. Aus dem Verlauf der Wachstumskurven wurde auf eine induzierte "phänotypische Resistenz" der Zellen geschlossen, die auf einer verstärkten Enzymsynthese des durch 2-Aminobuttersäure blockierten Isoleucin-Valin-Weges beruht. Eine Blockierung dieser Enzyme würde auch einen Leucinmangel verursachen und so eine Derepression der IPM-Synthase hervorrufen können.

Bei M. denitrificans bewirkte 2-Aminobuttersäure zwar eine Wachstumshemmung, aber keine Derepression der IPM-Synthase (FISCHER, 1973).

Dagegen wurde bei H. eutropha H 16 durch 100 mM 2-Aminobuttersäure nach Beginn des verhältnismäßig schnell wieder einsetzenden Wachstums (Abb. 4) eine fast 3-fach erhöhte IPM-Synthase-Aktivität (28 E/g Protein bei 30^{o} C) gefunden.

Auf Grund ihrer zu den natürlichen Substraten analogen Struktur sollte auch Citraconsäure eine Derepression der IPM-Synthase durch eine kompetitive Hemmung der Leucinbiosyntheseenzyme bewirken. H. eutropha H 16 kann mit Citraconsäure als einziger C-Quelle wachsen. Nach REH (unveröffentlichte Ergebnisse) soll dabei die ß-Isopropylmalat-Isomerase eine

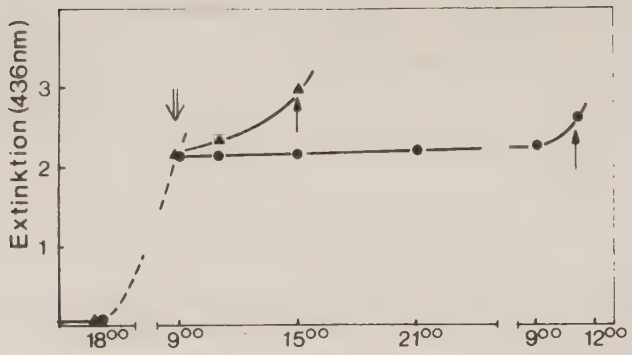


Abb. 4 Der Einfluß von Citraconsäure und 2-Aminobuttersäure auf eine wachsende Kultur von H. eutropha H 16

Verwendet wurde eine 1 l-Rührkultur mit Fructose-Mineral-Medium (s. Methoden II. 2.). Angeimpft war mit je 1 ml einer stationären Vorkultur. Die Extinktionsänderungen wurden in Aliquots von 1 ml bestimmt.

⇓ Zugabe von 100 mM α-Aminobuttersäure (- ▲ -) bzw. 100 mM Citraconsäure (- ● -)

↑ Zeitpunkt der Zellernte

katabolische Funktion haben. Die katabolische Reaktion würde dann in Konkurrenz zur Biosynthese des L-Leucins ablaufen und damit, zumindest vorübergehend, einen Leucinmangel und somit eine dereprimierte IPM-Synthase-Bildung bewirken.

Durch Zugabe von 100 mM Citraconsäure zu einer wachsenden Kultur (1l Schüttelkultur) wurde in H. eutropha H 16 eine längere Wachstumshemmung erzielt (Abb. 4). Die Zellen, nach erneut beginnendem Wachstum geerntet, zeigten jedoch keine Erhöhung der IPM-Synthase-Aktivität (9,5 E/g Protein bei 30° C Testtemperatur).

1.2.4 Die Enzymaktivität in der Mutante A 81 von H. eutropha H 16 und den davon abgeleiteten Revertanten

REH (1967) hatte eine für L-Valin und L-Isoleucin doppelauxotrophe Mutante von H. eutropha H 16 (kurz mit H 16 - A 81 bezeichnet) isoliert. Im Rohextrakt (Ultraschall-Aufschluß, s. III.3.1 von H 16 - A 81 wurde eine IPM-Synthase-Aktivität von 17 - 18 E/g Protein (30° C Testtemperatur) gefunden, wenn die Zellen in Fructose-Mineralmedium mit je 2 mM L-Valin und L-Isoleucin angezogen worden waren. In Nutrient Broth angezogene Zellen von H 16 - A 81 zeigten eine Aktivität von 32 - 35 E/g Protein. Die verschiedenen Werte spiegeln die unterschiedlichen Derepressionsbedingungen wieder.

Wurde die Mutante unter ständiger Derepressionsbedingung angezogen, d.h. in Fructose-Mineralmedium mit L-Valin (L-Isoleucin) als begrenzendem Wachstumsfaktor, so betrug die Enzymaktivität etwa 120 E/g Protein (s. III. 2). Bei einer Anzucht konnten sogar 334 E/g Protein gemessen werden.

Die unterschiedlichen Enzymaktivitäten in den einzelnen Anzuchten beruhten vor allem auf dem jeweiligen Anteil an spontan entstehenden Revertanten. Diese zeigen eine ähnlich niedrige Enzymaktivität wie der Wildtyp und überwachsen, da sie nicht mehr auf die Aminosäuren angewiesen sind, die unter Derepressionsbedingungen langsamer wachsenden auxotrophen Mutanten. ZAMENHOF und EICHHORN (1967) hatten allgemein gezeigt, daß regulationsdefekte Mutanten leicht von Revertanten, die eine normale Regulation aufweisen, überwachsen werden. Größere Kolonien, die auch auf Fructose-Mineralplatten mit Aminosäuren auftraten, waren fast immer Revertanten, wie durch Überstempeln auf Fructose-Mineral-Agarplatten mit und ohne L-Valin und L-Isoleucin nachgewiesen wurde. In vier Revertanten wurde nach Anzucht in Nutrient Broth die IPM-Synthase-Aktivität bestimmt; sie betrug 11,3; 14; 18,3 und 19,2 E/g Protein (30° C Testtemperatur).
In Abb. 5 ist eine Wachstumskurve einer 10 l Kultur unter Derepressionsbedingungen von H 16 - A 81 im Mikroferm-Fermenter wiedergegeben. Dabei wurde die Aktivität der IPM-Synthase verfolgt. Während des Zutropfens

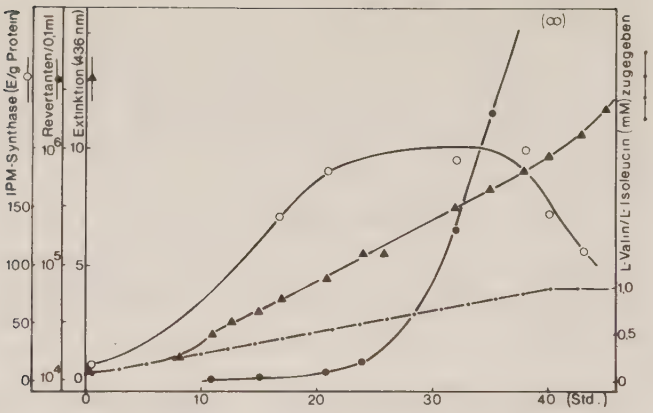


Abb. 5 Bestimmung der IPM-Synthase-Aktivität im Verlauf einer Wachstumsperiode unter Derepressionsbedingungen

Die Wachstumskurve wurde in einem Braun-Fermenter (Biostat) mit einem Nutzvolumen von 8 - 9 l aufgenommen. Verwendet wurde Fructose-Mineralsalzlösung, der die Aminosäuren L-Isoleucin und L-Valin so zugetropft wurden, daß nach 40 h je 1 mmol Aminosäure / l Nährlösung zugegeben war.
Gerührt wurde mit einem Blattrührwerk bei 500 U/min. Die Belüftung erfolgte durch Preßluft mit einem Durchsatz von 7 - 8 l/min. Die Proben von 300 - 800 ml für die Enzymbestimmung wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen und durch Eiszugabe sofort gekühlt. Die Aufarbeitung wurde, wie in METHODEN beschrieben, durchgeführt. Zur Bestimmung der Revertanten wurden 1 ml Proben steril entnommen und 0,1 ml sowie eine 1 : 100 und $1:10^4$ Verdünnung auf Fructose-Mineral-Agarplatten ausgespatelt und 3 - 4 Tage bei 28° C bebrütet.

der Aminosäuren zu dem Medium, dem vorher kein L-Valin und kein Isoleucin zugegeben war, verlief das Wachstum nahezu linear. Während dieser Phase stieg die Enzymaktivität stark an, auf fast 200 E/g Protein, um dann, als die Kultur auf Grund der sich schnell vermehrenden Revertanten schneller wuchs, auf unter 140 E/g Protein abzusinken. Die Menge der Revertanten

wurde durch Ausstreichen auf Fructose-Mineralmedium bestimmt.
Für die Anzucht von Zellmaterial mit möglichst hoher IPM-Synthase-Aktivität für die Enzymanreicherung lag das Problem im schnellen Erkennen der Revertanten. Da dies aber nicht direkt möglich war - der Test auf Agarplatten dauerte wenigstens 48 Stunden -, wurde bei der Anzucht nur die Trübungszunahme genau verfolgt. Bei einem Abweichen von einem linearen Wachstum wurde die Kultur sofort gekühlt und vorzeitig geerntet.

1.3 Prüfung auf verschieden regulierte IPM-Synthasen in H. eutropha H 16

Sowohl in S. typhimurium (O'NEILL und FREUNDLICH, 1972; BLATT et al., 1972) als auch in E. coli M 42 - 11 (BLATT et al., 1972) sind zwei Acetohydroxysäure-Synthasen (AHS-Synthasen) mit gleichen Biosynthesefunktionen, aber unterschiedlicher Regulation gefunden worden. O'NEILL und FREUNDLICH wiesen nach, daß in S. typhimurium nur die eine Form der AHS-Synthase sensitiv für eine Feedbackhemmung durch L-Valin ist. Die Synthese dieser Form wird allein durch L-Valin und L-Leucin reprimiert, während die Bildung der anderen Form, die gegenüber L-Valin unempfindlich ist, multivalent durch L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin reguliert wird.
BLATT et al. isolierten eine AHS-Synthase, die sensitiv für eine Endproduktinhibition durch L-Isoleucin, L-Leucin und L-Valin ist, und eine zweite, die für diese Aminosäuren insensitiv ist. Die Enzymsynthese der ersteren unterliegt einer multivalenten Repression durch L-Valin und L-Leucin, während die Bildung der zweiten Form durch die multivalente Repression aller drei Aminosäuren reguliert wird.
Ein Hinweis auf zwei IPM-Synthasen in H. eutropha H 16 wäre, daß bisher keine Mutanten mit fehlender IPM-Synthase gefunden wurden und daß die Hemmung durch L-Leucin nicht zu 100 % erfolgt, so daß u. U. auch eine Leucin-insensitive Synthase vorhanden sein könnte.
Möglich wäre auch ein für L-Valin insensitives Enzym. Zur Beantwortung

der Frage wurde der Einfluß von L-Leucin und L-Valin auf die IPM-Synthase-Aktivität aus den unter verschiedenen Anzuchtbedingungen erhaltenen Zellen (s. III. 1. 2. 2) im Enzymtest geprüft. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse wiedergegeben. Es zeigten sich keine signifikanten Änderungen in der Wirkung von L-Leucin und L-Valin, so daß keine unterschiedlich hemmbaren IPM-Synthasen in H. eutropha H 16 zu existieren scheinen.

Tab. 3 Der Einfluß von L-Leucin und L-Valin auf die IPM-Synthase aus verschiedenen Anzuchten

Zusatz zum Medium während der Anzucht (je 5 mM)	pH = 7,5 ohne Zusätze zum Test ≙100 % Fl.E.*	0,1 mM L-Leucin		0,5 mM L-Valin		0,05 mM L-Leucin, 0,5 mM L-Valin	
		Fl.E.	%	Fl.E.	%	Fl.E.	%
ohne	150	55	37	185	123	130	87
L-Leucin	110	37	34	–	–	105	95
L-Valin	93	35	38	105	113	70	75
L-Isoleucin	119	46	39	132	111	100	84
L-Threonin	20	7	35	22	110	16	80
L-Isoleucin, L-Leucin	45	18	40	50	110	44	98
L-Isoleucin, L-Valin	425	225	53	455	105	370	87
L-Isoleucin, L-Valin, L-Leucin	106	30	28	–	–	82	77
L-Isoleucin, L-Valin, L-Leucin, Ca-Pantothenat (20 mg/l)	84	34	40	96	114	69	82

*Fl.E. = rel. Fluoreszenzeinheiten

2. Die Anzucht von Zellmaterial für die Enzymanreicherung

Für die Anreicherung der IPM-Synthase wurde die Mutante H. eutropha H 16 - A 81 (H 16 - A 81) unter Derepressionsbedingungen angezogen. Die Anzucht erfolgte hauptsächlich im 8 - 10 l Fermenter mit Fructose-Mineral-Medium, dem je 0,25 mM L-Valin und L-Isoleucin zugesetzt waren. Mit Hilfe einer Pumpe und eines Zeitgebers wurden zusätzlich L-Valin und L-Isoleucin so zugetropft, daß nach 30 h je 0,5 mmol je Liter Nährlösung zugegeben waren.

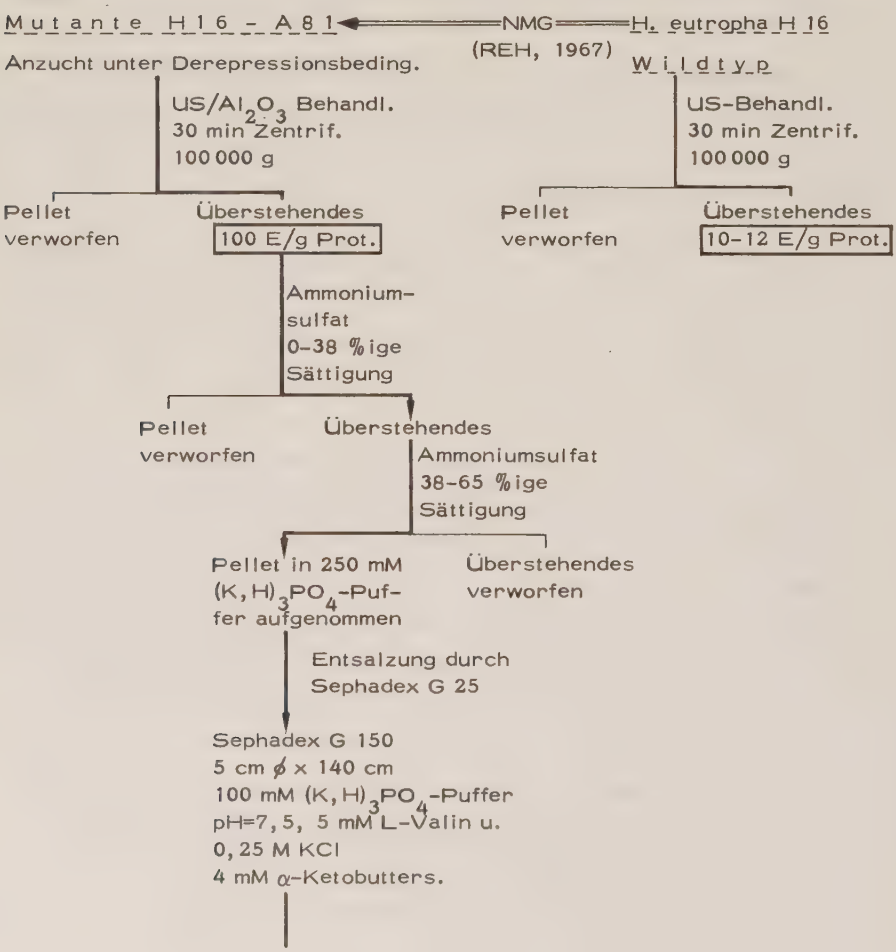
Die Ausbeute an Zellen betrug ca. 3 - 6 g Zellen (NG)/l, die spezifische Aktivität der IPM-Synthase betrug zwischen 100 und 150 E/g Protein. Die am besten gelungene Anzucht mit der Enzymaktivität von 334 E/g Protein (US-Aufschluß) ergab 4,75 g NG/l Nährlösung.

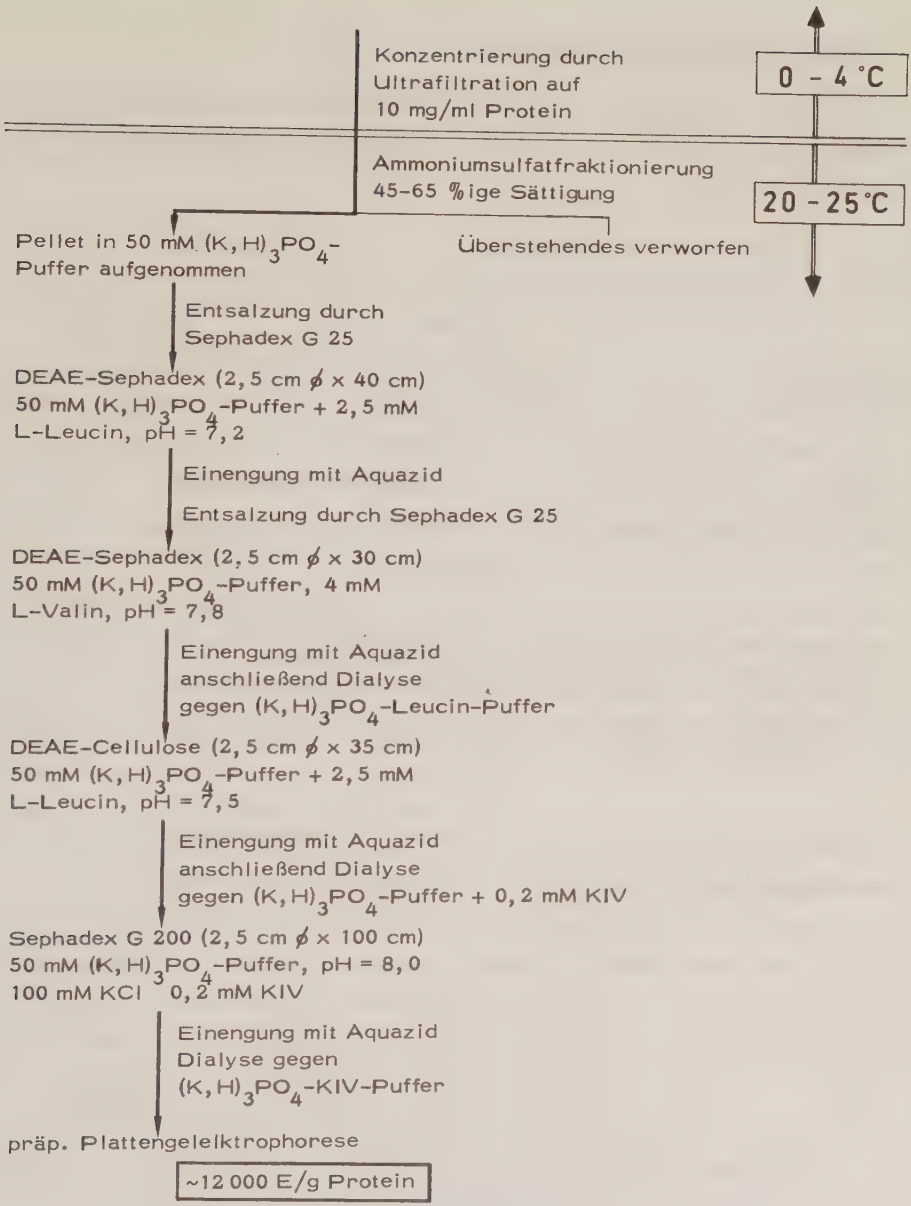
Die Versuche, 100 l Kulturen analog der 10 l Kultur anzuziehen, mißlangen, da nach 12 - 16 h Wachstum im 100 l Fermenter die Revertanten durchwuchsen. Auch höhere Gaben von Aminosäuren in den Vorkulturen konnten dies nicht verhindern. In der 10 l Vorkultur konnten schon 0,1 % Revertanten nachgewiesen werden.
Eine brauchbare 100 l Kultur wurde auf folgende Weise erhalten: 15 Schrägröhrchen (FM-Medium, je 2 mM L-Isoleucin und L-Valin) wurden mit je einer Kolonie beimpft; gleichzeitig wurde mit dem jeweils gleichen Material eine Kontrollplatte ausgestrichen. Nach 60 h wurden die Schrägröhrchen mit steriler Saline abgeschlemmt. Damit wurden 8 l FM-Nährlösung, mit je 1 mM L-Valin und L-Isoleucin, beimpft. Nach 19 h wurde mit dieser einzigen Vorkultur der 100 l Fermenter beimpft und dieser dann analog dem 10 l Fermenter unter Derepressionsbedingungen angezogen.
Die Ausbeute dieser Kultur betrug nach 36 h Wachstum 500 g NG bei einer Enzymaktivität von 140 E/g Protein im Rohextrakt (US-Aufschluß).
Durch die Lagerung der Zellen, insbesondere wohl durch das Einfrieren und Auftauen, sank die Aktivität auf ca. 100 E/g Protein ab.

3. Anreicherung der IPM-Synthase

Im Schema 2 ist der Anreicherungsgang kurz zusammengefaßt. Die einzelnen Schritte, von der Mutante H 16 - A 81 ausgehend, werden anschließend erläutert und unter METHODEN ausführlich beschrieben.

Schema 2: Anreicherung der IPM-Synthase aus H. eutropha H 16 - A 81




Konzentrierung durch
Ultrafiltration auf
10 mg/ml Protein
0 - 4 °C
Ammoniumsulfatfraktionierung
45-65 %ige Sättigung
20 - 25°C
Pellet in 50 mM (K, H)3PO4-
Puffer aufgenommen
Überstehendes verworfen
Entsalzung durch
Sephadex G 25
DEAE-Sephadex (2, 5 cm ⌀ x 40 cm)
50 mM (K, H)3PO4-Puffer + 2, 5 mM
L-Leucin, pH = 7, 2
Einengung mit Aquazid
Entsalzung durch Sephadex G 25
DEAE-Sephadex (2, 5 cm ⌀ x 30 cm)
50 mM (K, H)3PO4-Puffer, 4 mM
L-Valin, pH = 7, 8
Einengung mit Aquazid
anschließend Dialyse
gegen (K, H)3PO4-Leucin-Puffer
DEAE-Cellulose (2, 5 cm ⌀ x 35 cm)
50 mM (K, H)3PO4-Puffer + 2, 5 mM
L-Leucin, pH = 7, 5
Einengung mit Aquazid
anschließend Dialyse
gegen (K, H)3PO4-Puffer + 0, 2 mM KIV
Sephadex G 200 (2, 5 cm ⌀ x 100 cm)
50 mM (K, H)3PO4-Puffer, pH = 8, 0
100 mM KCl 0, 2 mM KIV
Einengung mit Aquazid
Dialyse gegen
(K, H)3PO4-KIV-Puffer
präp. Plattengelelktrophorese
~12 000 E/g Protein

3.1 Wahl der Aufschlußmethode

Es wurden mehrere Aufschlußmethoden geprüft und auf ihre Effektivität bezüglich der IPM-Synthase-Aktivität untersucht (Tab. 4, Einzelheiten s. Methoden, 5.1-4).

Tab. 4 Vergleich der Aufschlußmethoden

Aufschluß mit	E/g Protein	E/g NG Zellen
Ultraschall	120	12 600
Al_2O_3 (Alcoa 303)	170	9 400
French-Presse (5 x)	100	7 000
Glaskugeln (MSE-Homogenisator)	150	20 200

Es wurden die Zellen aus einer 10 l Kultur (Derepressionsbedingungen) verwendet. Die Zellen waren in 250 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 7,5, mit 2 mM α-Ketobuttersäure und 5 mM L-Valin suspendiert.
Für den Al_2O_3-Aufschluß wurden abzentrifugierte Zellen verwendet.
Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (30 min bei 25 000 g abgetrennt).
Der Überstand wurde zum Test eingesetzt.

Den besten Aufschluß ergab das Verreiben der Zellen mit Aluminiumoxyd. Das Enzym war in diesem Extrakt, im Gegensatz zu den durch die anderen Methoden gewonnenen Extrakten, über 8 h nahezu stabil. Für große Zellmengen war dieser Aufschluß jedoch nicht geeignet; außerdem konnte er aus persönlichen Gründen nicht weitergeführt werden. Die höhere Enzymausbeute bei dem Aufschluß im MSE-Homogenisator mit den Glaskugeln ging bei der Anreicherung (Ammoniumsulfatfällung) sofort wieder verloren, so daß diese Methode keinen Vorteil brachte. Die Zellen wurden daher hauptsächlich durch kontinuierliche Ultraschallbehandlung aufgeschlossen.
Für kleine Zellmengen bei vergleichenden Untersuchungen war der Aufschluß durch die Ultra-Schallbehandlung nicht geeignet, da die Temperatur in kleinen Proben schlecht konstant zu halten war. Temperaturunterschiede

(> 8° C) beim Aufschluß wirkten sich aber auf die IPM-Synthase-Aktivität aus. Für diese Fälle wurde der Aufschluß in der Frenchpresse, die schonendste Aufschlußmethode, gewählt.

3.2 Adsorption der IPM-Synthase

Da im resuspendierten Sediment der Aufschlüsse mit Ultraschall bis zu 40 % der Enzymaktivität des Überstehenden gefunden wurde und nach erneuter Zentrifugation der Resuspension ca. nur 50 % im neuen Überstehenden zu finden war, sollte durch den schonenden Aufschluß mit der Frenchpresse und niedrigtourige Zentrifugation festgestellt werden, ob die IPM-Synthase wider Erwarten an größere Einheiten gebunden ist (KIRITANI et al., 1965).
Schon nach einmaligem Durchpressen und einer Zentrifugation von 1 000 g wurde die gleiche Aktivitätsverteilung wie nach der Ultraschallbehandlung gefunden. Nach jedem Resuspendieren des Niederschlages und erneuter Zentrifugation konnte jeweils 50 % der Aktivität der Suspension im jeweili-Überstehenden nachgewiesen werden.
Es wird angenommen, daß das Enzym während des Aufschlusses unspezifisch gebunden wird und zwar an basische Gruppierungen des Niederschlages (vergleiche dazu III. 4. 4) und nicht partikelgebunden ist.

3.3 Versuche zur Stabilisierung der IPM-Synthase

Die IPM-Synthase war in Phosphatpuffer, aber mehr noch in Tris/HCl-Puffer, instabil. Eine teilweise Stabilisierung gelang in Phosphatpuffer (250 mM) durch Zugabe von L-Valin (5 mM), α-Ketoisovaleriansäure (0, 5 mM) und KCl (0, 1 M). Die α-Ketoisovaleriansäure (natürliches Substrat) wurde

durch die sehr viel preiswertere α-Ketobuttersäure (4 mM) ersetzt.
In dieser Lösung war die IPM-Synthase 2 h stabil; nach 3 h bei 0° C waren aber auch hier nur noch 90 % der Aktivität vorhanden. Das Enzym (Rohextrakt), in obigem Puffer bei - 18° C eingefroren, hatte nach 1 h 2 %, nach 24 h 8 - 10 %, nach 8 Tagen 15 % und nach 2 Monaten 18 % an Aktivität verloren (Tabelle 5).
Durch Mercaptoäthanol wurde die Stabilität stark erniedrigt, selbst bei dem 8-fach angereicherten Enzym. Auch das durch Leucin gehemmte Enzym ließ sich nicht mit Mercaptoäthanol stabilisieren.
Keinerlei Einfluß auf die Stabilität des Enzyms zeigten Schwermetalle (Schwermetallösung ohne EDTA nach Prof. Pfennig, 0,1 %ig und 1 %ig), Glycerin und Ammoniumsulfat (20 %ige Sättigung). Um das Enzym vor Peptidasen zu schützen, wurden Rohextrakte mit verschiedenen Proteinlösungen in hoher Konzentration versetzt.
Damit diese Proteine die Anreicherung nicht störten, wurden aus 5 %igen Lösungen von Bacto-Pepton, Bacto-Trypton und Oxoid-Casein (Säure-Fällung) störende Proteine mit Ammoniumsulfat (bis zu 70 %iger Sättigung) ausgefällt. Der Überstand wurde - nach Dialyse - im Verhältnis 1 : 1 zum Rohextrakt hinzugegeben. Nach 12 h zeigte die mit Oxoid-Casein-Extrakt versetzte Probe noch 65 % der Aktivität, während die Kontrollprobe nur noch 31 % aufwies. Die anderen Proben hatten noch weniger Aktivität, was darauf hindeutet, daß im Überstand der Ammoniumsulfatfällung noch proteolytische Enzyme enthalten waren.
Die, wenn auch geringe Stabilisierung durch Oxoid-Casein-Zusatz ließ vermuten, daß der starke Aktivitätsabfall der IPM-Synthase im Rohextrakt evtl. auf Proteasen zurückzuführen ist. Daraufhin wurde bei 0° C der Einfluß von Reagenzien, die eine hemmende Wirkung auf Proteasen haben, auf die Stabilisierung der IPM-Synthase-Aktivität geprüft. Dazu wurde Rohextrakt (20 mg Protein/ml) in 250 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer (pH = 7,5 mit 200 mM KCl) mit 10 und 100 mM Kaliumfluorid bzw. mit 1 mM EDTA oder 2 mM Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) bei 0° C inkubiert; die Aktivität wurde im

Tab. 5 Inaktivierung der IPM-Synthase im Rohextrakt von H. eutropha H 16

Puffer und Zusätze / Inkubationszeit (0° C)	10 min		1 h		2 h		3 h		5 h	
	Fluoresz. Einh.	%	Fluoresz. Einh.	%	Fluoresz. Einh.	%	Fluoresz. Einh.	%	Fluoresz. Einh.	%
TRIS/HCl 50 mM pH 7,5	258	100	240	93	200	77,5	185	72	135	52,5
$(K,H)_3PO_4$ 50 mM pH 7,5	250	100	235	94	225	90	218	87,5	190	76
$(K,H)_3PO_4$ 250 mM pH 6,5	220	100	209	95	201	91,5	147	67	103	47
$(K,H)_3PO_4$ 250 mM pH 8,2	240	100	209	87	154	64	137	57	102	42,5
$(K,H)_3PO_4$ 250 mM pH 7,5	280	100	275	98	262	93	250	89	225	80,5
$(K,H)_3PO_4$ + L-Leucin 2 mM	98	35	67	24	43	16	37	13,4	29	10,4
$(K,H)_3PO_4$ + L-Valin 5 mM	275	95	275	95	270	96,5	252	90	238	85
$(K,H)_3PO_4$ + KIV 0,1 mM	284	101,4	273	97,5	270	96,5	260	93	230	82
$(K,H)_3PO_4$ + α-Ketobutters. 4 mM + Valin 5 mM + KCl 100 mM	310	100	309	99,8	312	100,5	278	89,5	275	89
	1 h		24 h		8 Tage		2 Monate		3 Jahre	
desgl. wie vorher, aber eingefroren – 18° C	304	98	270	90,5	262	84,5	253	81,7	46,5	15

Während der Inkubation betrug die Proteinkonzentration ca. 10 mg/ml. Es wurden Zellen in Tris/HCl-Puffer, PO_4-Puffer, 50 mM, pH = 7,5 und PO_4-Puffer, 250 mM, pH = 6,5; 7,5; 8,2 jeweils getrennt durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Durch anschließende Zentrifugation (30 min, 20 000 U/min) wurden die Zelltrümmer abgetrennt. Die Effektoren wurden direkt nach dem Zentrifugieren dem Rohextrakt (PO_4-Puffer, 250 mM, pH = 7,5) zugesetzt. Die Aktivität wurde im fluorimetrischen Test (s. Methoden) bei pH = 7,8 Tris/HCl und 37 °C bestimmt. Gestartet wurde jeweils mit 10 µl Extrakt.

fluorimetrischen Test bestimmt. EDTA unterstützt in geringem Maße die Inaktivierung. Durch KF- und PMSF-Zusatz bleibt die Aktivität etwas besser erhalten als in der Kontrollprobe, so daß auf eine Hemmung der Proteasen zu schließen ist. Aber durch keinen der Zusätze konnte die Aktivität vollständig geschützt werden. Dennoch wurde beim Aufschluß der Zellen stets 100 mM KF (KF ist sehr viel preisgünstiger als PMSF) zugesetzt, um eine mögliche Veränderung des Enzyms durch Proteolyse so weit wie möglich zu verhindern.

Tab. 6 Wirkung von Proteasenhemmstoffen auf die Stabilisierung der IPM-Synthase im Rohextrakt

zugesetzter Hemmstoff	mM	Fluoreszenz-Einheiten nach 0 h	%	2 h	%	6 h	%
kein Zus.	-	260	100	235	90,5	165	63
KF	10	255	98	240	92	195	75
KF	100	265	102	240	92	200	77
EDTA	1	250	96	230	88,5	145	56
PMSF	2	260	100	250	96	200	77

Der Testansatz (s. Methoden) wurde mit 50 µl Rohextrakt gestartet. Die Inkubationszeit betrug 20 min.

3.4 Fällung der Nukleinsäuren

Eine direkte Abtrennung der Nukleinsäuren vor der Proteinfraktionierung war nicht möglich gewesen. Es wurden Cetyl-trimethyl-Ammoniumbromid, Streptomycinsulfat, DNase/RNase, Protaminsulfat in $(K,H)_3PO_4$-Puffer (pH= 7,8) und in H_2O (pH = 5,0) verwendet. In allen Fällen führte die Behandlung des Extraktes zu einer Kopräzipation oder Inaktivierung des Enzyms. Die Nukleinsäuren mußten nach und nach während der Enzymanreicherung abgetrennt werden. Die Hauptmenge (ca. 80 %) wurde bei den ersten zwei Enzymanreicherungsschritten, der Ammonsulfatfraktionierung (Fraktion 0 - 35 %ige Sättigung) und der sich anschließenden Gelfiltration über Sephadex G 150 abgetrennt, die letzten Spuren wurden durch die Chromatographie an DEAE-Sephadex A 50 aus der das Enzym enthaltenden Proteinfraktion entfernt.

3.5 Erste Ammoniumsulfatfraktionierung

Eine erste Proteinfraktionierung erfolgte durch eine Fällung mit Ammoniumsulfat. Das Enzym konnte im Bereich 35 - 70 %iger Sättigung an Ammoniumsulfat mit einer Ausbeute von ca. 75 % ausgefällt werden. Der Fraktionierungsbereich fiel durch die Anwesenheit der Nukleinsäuren sehr weit aus. Waren sie, wie anfangs durchgeführt, vorher mit Protaminsulfat zum großen Teil abgetrennt worden, verringerte sich bei 80 %iger Ausbeute der Bereich auf 40 - 60 %ige Sättigung an Ammoniumsulfat.

3.6 Gelfiltration auf Sephadex G 150

Zur weiteren Anreicherung wurde eine Säule (5 x 140 cm) mit Sephadex G 150 verwendet, die mit Phosphatpuffer (0,1 M; pH = 7,5), KCl (0,25 M),

Valin (5 mM) und α-Ketobuttersäure (4 mM) äquilibriert war. Auf ihr ließen sich bis zu 30 ml eines resuspendierten Niederschlages der Ammoniumsulfatfällung nach einer weitgehenden Entsalzung mit Sephadex G 25 auftrennen. Bei einer Ausbeute bis zu 80 % konnte mit diesem Schritt eine 2 - 2,5fache Anreicherung erzielt werden. Die Trennung durfte jedoch nicht viel länger als 35 Stunden dauern, sollte die Ausbeute sich nicht stark verringern. Die Abb. 6 zeigt ein typisches Elutionsdiagramm.

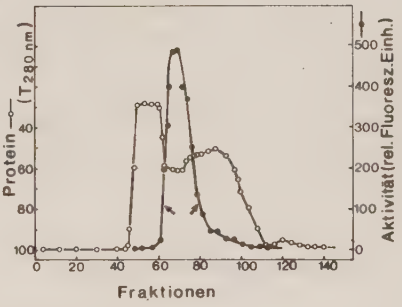


Abb. 6 Elutionsdiagramm der IPM-Synthase bei der Gelfiltration mit Sephadex G 150

Zur Gelfiltration wurde eine Säule von 5 cm ⌀ x 140 cm Länge aus Sephadex G 150 bei 0 - 4° C verwendet, die mit 0,1 M $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 7,5, 5 mM L-Valin, 0,25 M KCl und 4 mM α-Ketobuttersäure äquilibriert war. Es wurden 30 ml Extrakt (Ammoniumsulfatfraktionierung) aufgegeben. Die Fraktionsstärke betrug ca. 18 ml. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im fluorimetrischen Test (s. Methoden), der mit 100 µl Extrakt gestartet wurde. Die Fraktionen mit einer größeren Aktivität als 100 rel. Fluoreszenzeinheiten wurden vereinigt. Die Pfeile deuten auf die erste und letzte dieser Fraktionen. Die vereinigten Proben wurden durch Ammoniumsulfatfraktionierung eingeengt.

Die vereinigten Fraktionen mit IPM-Synthase-Aktivität wurden in einer Diaflokammer nahezu verlustfrei auf die Hälfte des Volumens eingeengt, um für die nachfolgende Ammoniumsulfatfällung eine genügend hohe Proteinkonzentration zu erhalten.

3.7 Zweite Ammoniumsulfatfraktionierung

Von der zweiten Ammoniumsulfatfraktionierung an wurden alle Arbeiten nur noch

bei Raumtemperatur ausgeführt, da das Enzym, wie sich herausgestellt hatte, kältelabil ist (s. III. 4. 2). Bisher waren alle Operationen bei 0 - 4° C durchgeführt worden, da bei höheren Temperaturen die Proteasenaktivität, trotz der zugesetzten Inhibitoren, zu hoch war. Die Kältelabilität machte sich erst besonders stark bei den niedrigen Proteinkonzentrationen während der Chromatographie an Ionenaustauschern bemerkbar.
Den Pufferlösungen wurde 0,05 % NaN_3 zugefügt, um ein Bewachsen mit Mikroorganismen zu verhindern (NaN_3 hat keine Wirkung auf die IPM-Synthase-Aktivität).

Bei der erneuten Ammoniumsulfatfraktionierung präzipitierte die Hauptmenge der IPM-Synthase im Bereich 45 - 65 %iger Sättigung (auf 0° C bezogen) an Ammoniumsulfat. Durch diese Fällung wurde das Enzym bei einer 1,2 - 1,5-fachen Anreicherung für diesen Schritt gleichzeitig weiter eingeengt.

3. 8 Erste Chromatographie an DEAE-Sephadex A 50

Durch Gelfiltration über Sephadex G 25 wurde die Enzymlösung von Ammoniumsulfat befreit und gleichzeitig umgepuffert. Anschließend wurde das Enzym auf eine DEAE-Sephadex A50-Säule aufgebracht. Diese war wie die vorher verwendete Sephadex G 25-Säule mit $(K,H)_3PO_4$-Puffer (50 mM; pH = 7,2), 0,05 M KCl, 0,05 % NaN_3 und 2,5 mM L-Leucin äquilibriert. Es hatte sich gezeigt, daß die Gegenwart von 2,5 mM L-Leucin die Ausbeute bei der Chromatographie erhöhte. Obwohl DEAE-Sephadex ein Anionenaustauscher ist, wurde Phosphatpuffer verwendet, da er zu besseren Ergebnissen als der Kationenpuffer Tris/HCl führte.
Die Elution des Enzyms erfolgte durch einen linearen KCl-Gradienten (Abb. 7).
Zur Bestimmung der Aktivität in den Fraktionen wurde von diesem Anreicherungsschritt an, statt des langwierigen fluorimetrischen Testes, der schnelle

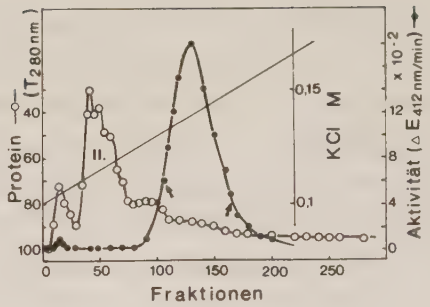


Abb. 7 Chromatographie an DEAE-Sephadex A 50 bei pH = 7,2 in Gegenwart von L-Leucin

Zur Chromatographie wurde DEAE-Sephadex A 50-Gel bei einer Säulenabmessung von 2,5 cm ⌀ und 40 cm Länge bei 23° C verwendet. Aufgetragen wurde der über Sephadex G 25 gelfiltrierte Extrakt von der zweiten Ammoniumsulfatfraktionierung. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0,1 M bis 0,2 M KCl (je 1 l) in 50 M $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 7,2 unter Zusatz von 0,05 % NaN_3 und 2,5 mM L-Leucin. Das Gel war vorher mit dem Puffersystem bei 0,05 M KCl äquilibriert worden. Die Fraktionsstärke betrug ca. 6 ml.

und empfindliche Test mit DTNB verwandt. Dadurch konnte auch die Abtrennung (Abb. 7, Fraktion II) der Thioesterasen verfolgt werden. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der Anreicherungsschritte wurde weiter einheitlich der Fluoreszenztest verwendet. Zur Entscheidung, wie weit es sich jeweils um die IPM-Synthase handelte, diente im optischen Test der Vergleich eines Ansatzes ohne KIV. Eine Reaktion ohne KIV wurde als Acylasenaktivität angesehen.

Die Einengung der Fraktionen mit hoher Aktivität an IPM-Synthase, aber geringem Proteingehalt, durch Ammoniumsulfat brachte starke Verluste, desgleichen ein Einengen in der Diaflokammer. Bei Verwendung des Filters PM 30 für $(K,H)_3PO_4$-Puffer mit organischen Säuren denaturierte das Enzym völlig, bei dem Filter UM 20 E für Phosphatpuffer unter 50 mM und für Lösungen ohne organische Säuren trat teilweise ein Aktivitätsverlust von 50 % ein. Eine Konzentrierung des Enzyms bei einer Ausbeute von 80 - 90 % gelang schließlich mit Aquazid I. Bei dieser Methode wurde, im Gegensatz zur Einengung in der Diaflokammer, die Ionenstärke stark erhöht, was aber keinen Einfluß auf die Aktivität der IPM-Synthase hatte (vgl. III. 4. 2).

3.9 Zweite Chromatographie an DEAE-Sephadex A 50

Durch Änderung der Bedingungen, d.h. durch Zusatz eines anderen Effektors und durch Erhöhung des pH-Wertes, konnte bei erneuter Chromatographie an DEAE-Sephadex A 50 eine weitere Anreicherung erzielt werden. Der pH-Wert betrug 7,8. Anstelle des Inhibitors L-Leucin wurde der Aktivator L-Valin zugesetzt. Die Elution des Enzyms erfolgte wiederum mit einem linearen KCl-Gradienten (Abb. 8).

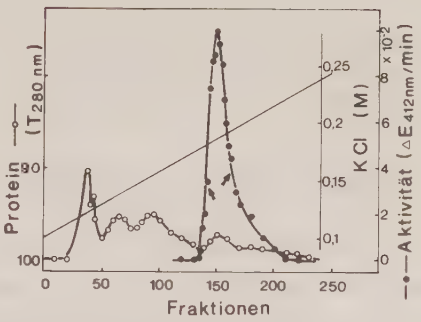


Abb. 8 Chromatographie an DEAE-Sephadex A 50 bei pH = 7,8 in Gegenwart von L-Valin

Die Chromatographie erfolgte wie unter Abb. 7 beschrieben. Die veränderte Elution erfolgte durch einen linearen KCl-Gradienten von 0,1 M bis 0,25 M in 50 M $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 7,8 mit 4 mM L-Valin anstelle von L-Leucin. Die Chromatographie wurde im Anschluß an die Chromatographie bei pH = 7,2 nach Einengung der IPM-Synthase enthaltenen Fraktionen (Aquazid I) durchgeführt.

Bei etwa 50 % Ausbeute erhöhte sich die spezifische Aktivität von ca. 4 000 auf 6 900 E/g Protein. Nach dieser Chromatographie waren stets die letzten Spuren an Thioesterasen (Acylasen) abgetrennt.
Die Fraktionen mit aktivem Enzym wurden erneut mit Aquazid I eingeengt und durch Dialyse entsalzt. Der Dialysepuffer enthielt wieder 2,5 mM L-Leucin zur Enzymstabilisierung.

3.10 Chromatographie an DEAE-Cellulose

Die weitere Proteinfraktionierung erfolgte durch Adsorptionschromatographie

auf DEAE-Cellulose bei pH = 7,5 und mit L-Leucin als Stabilisator. Das Enzym wurde mit einem linearen Salzgradienten eluiert. Bei einer 1,8fachen Anreicherung für diesen Schritt ergab sich eine Aktivität der IPM-Synthase bis zu 11 900 E/g Protein. Die Ausbeuten lagen um 35 - 40 %.

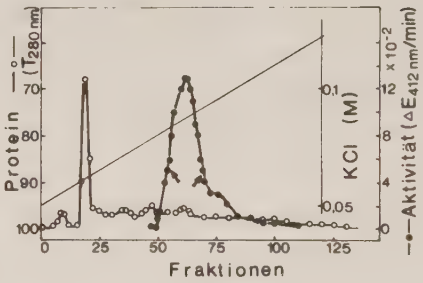


Abb. 9 Chromatographie der IPM-Synthase an DEAE-Cellulose

Die Chromatographie erfolgte an DEAE-Cellulose bei einem Säulenbett von 2,5 cm ⌀ x 35 cm Länge bei 23° C. Zur Elution diente ein linearer Salzgradient von 0,05 - 0,15 M KCl in 50 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 7,5 mit 2,5 mM L-Leucin. Die Fraktionsstärke betrug ca. 6 ml. Vereinigt wurden die Fraktionen 54 - 70.

3.11 Gelfiltration mit Sephadex G 200

An die DEAE-Cellulose-Chromatographie schloß sich eine Gelfiltration mit Sephadex G 200 an. Dabei wurde nur ein Proteinpeak eluiert. Die Aktivität der IPM-Synthase war nahezu proportional zur gemessenen Proteinkonzentration. Die spezifische Aktivität erhöhte sich auf ca. 12 000 E/g Protein (Abb. 10). Dies entspricht, bezogen auf den Rohextrakt der Mutante H 16 - A 81, einer etwa 120fachen Anreicherung, bzw. einer 1 200fachen Anreicherung, bezogen auf die Aktivität im Wildtyp.

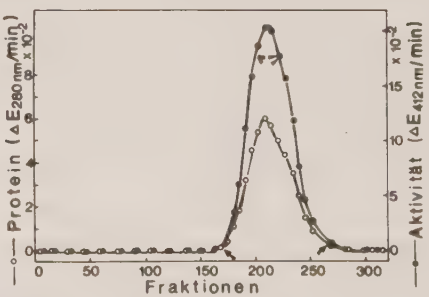


Abb. 10 Gelfiltration der IPM-Synthase durch Sephadex G 200

Das Gelbett zur Trennung betrug 2,5 cm ⌀ x 100 cm Länge. Es war mit 50 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH= 8,0, 100 mM KCl, 0,05 % NaN_3 und 0,2 mM KIV äquilibriert. Die Fraktionsstärke betrug ca. 3 ml. Aufgetrennt wurde der durch Aquazid I eingeengte und dialysierte Extrakt der DEAE-Cellulose-Chromatographie. Die Fraktionen 172 - 200, 200 - 220 und 220 - 260 wurden vereinigt und gelelektrophoretisch geprüft. Es wurden für alle drei Fraktionen eine identische Proteinverteilung im Gel gefunden.

3. 12 Gelelektrophorese

3. 12. 1 Analytische Gelelektrophorese

Das auf 12 000 E/g Protein angereicherte Enzym von der Sephadex G 200 Säule wurde durch analytische Gelelektrophorese auf 7 %igen Polyacrylamid-(PAA-)Gelen im System nach DAVIS (1964) in eine starke und drei schwächere Proteinbanden aufgetrennt. Beim Nachweis der IPM-Synthase im Gel durch die Reaktion von DTNB mit dem enzymatisch gebildeten CoA-SH, analog dem optischen Test bei 412 nm, traten drei Aktivitätsbanden auf. Die Hauptbande war nach ca. 1 min durch eine beginnende Gelbfärbung zu sehen, während die Nebenbanden erst nach 2 - 5 min sichtbar wurden. Da das entstehende gelbe Thiophenolation löslich ist, ergeben sich keine scharfen Banden, sondern schnell breiter werdende Zonen, die 10 - 15 min nach Beginn der Inkubation schon weitgehend verschmiert waren. Die Verteilung der Aktivitätsbanden im Gel ist in Abb. 11 A graphisch wiedergegeben.

Wurden die Aktivitätsbanden durch dünne Drähte im Gel markiert und anschließend die Proteine mit Amidoschwarz bzw. Coomassie Blue sichtbar gemacht, so zeigte sich, daß die Hauptaktivitätsbande mit der am langsamsten gewanderten Proteinbande, die auch das meiste Protein enthielt, zusammenfiel. Die am schnellsten gewanderte Proteinbande war mit der dritten Aktivitätsbande identisch. Unverständlich war, daß an der Stelle, an der die zweite, zwar schwache, aber eindeutige Aktivitätsbande lag, nie Protein nachgewiesen werden konnte.

Zwischen den Aktivitätsbanden lagen jeweils noch die anderen, schwachen Proteinbanden.

Um auszuschließen, daß es sich bei einer der erhaltenen Aktivitätsbanden um eine Thioesterasen- und nicht um die IPM-Synthase-Aktivität handelte, wurden parallele Gelröhrchen mit und ohne KIV inkubiert. Im Ansatz ohne KIV war auch bei verlängerter Inkubationszeit keine Färbung festzustellen.

Abb. 11 Verteilung der Protein- und Aktivitätsbanden in der analytischen Disk-Gelelektrophorese

Zur Gelelektrophorese wurden 0,5 cm x 7,5 cm Glasröhrchen und die analytische Elektrophoresekammer von SHANDON benutzt. Die Stromstärke betrug 3 mA pro Gelröhrchen (0,5 x 6,5 cm).

A: Elektrophoresesystem nach DAVIS (1964)

B: Elektrophoresesystem nach WILLIAMS und REISFELD (1964)

a) Proteinanfärbung mit Coomassie Blue

b) Enzymaktivität, durch DTNB-Reaktion sichtbar gemacht

c) Proteinanfärbung mit Coomassie Blue nach Re-Gelelektrophorese. Das Protein stammte aus der 1. Bande der präp. Elektrophorese im System nach WILLIAMS und REISFELD. (Verbreiterte Enzymbanden!)

d) Photo von Bb), bei verlängerter Elektrophorese zur besseren Darstellung der Banden

Da im System nach DAVIS der pH-Wert (pH = 8,9) und auch die TRIS-Konzentration (375 mM im Gel) sehr hoch liegen, wurde das System nach WILLIAMS und REISFELD (1964) mit einem pH-Wert von 7,5 und einer TRIS-Konzentration von 70 mM im Gel zum Vergleich herangezogen (Abb. 11 B).

In diesem System wurden neben einer Haupt- nur zwei Nebenproteinbanden

gefunden. Die Hauptproteinbande war wiederum am langsamsten gewandert und zeigte ebenfalls die stärkste IPM-Synthase-Aktivität. Die zweite Proteinbande war inaktiv, während die am schnellsten gewanderte Bande eine schwächere IPM-Synthase-Aktivität hatte. Der Test auf Thioesterase-Aktivität war auch in diesem System negativ.

3. 12. 2 Präparative Gelelektrophorese

Es wurde versucht, das Enzym in präparativem Maßstab gelelektrophoretisch aufzutrennen, die Banden zu charakterisieren und zu klären, ob es sich bei den erhaltenen Banden um eine Artefaktbildung oder um Isoenzyme handelte. Dazu wurde eine Plattengelelektrophoresekammer nach STEGEMANN (1970) und zunächst das System nach WILLIAMS und REISFELD verwendet. Die Markierung des Enzyms im Gel erfolgte wiederum durch die DTNB-Reaktion. Da das dabei gebildete CoA-SH das Enzym inaktivierte (s. III. 4. 8. 3), wurde es nur auf zwei abgetrennten Randstreifen und einem dünnen Mittelstreifen sichtbar gemacht. Nach der Lage der Aktivitätsbanden auf dem Streifen wurden aus der Gelplatte die Enzym enthaltenden Zonen ausgeschnitten und zum Eluieren des Enzyms zerkleinert.
Aus der ersten aktiven Bande konnten 20 - 30 % der Aktivität des aufgetragenen Enzyms eluiert werden, aus der zweiten Bande nur 5 %. Das Enzym aus der zweiten Bande war sehr instabil. Jegliches Filtrieren, um die Gelpartikel abzutrennen, zerstörte die Aktivität. Ebenso gingen bei beiden Eluaten durch ein einmaliges Einfrieren ca. 50 % der eluierten Aktivität verloren.
Das eluierte Enzym aus beiden Banden war kältelabil und ließ sich vor allem durch L-Leucin hemmen. Letzteres beweist, daß es sich bei beiden Banden um die IPM-Synthase handelte.
Die von Gel eluierte Enzymlösung der Hauptbande war durch in Lösung gegangenes oligomeres Acrylamid verunreinigt (bestimmt durch das Extink-

tionsverhältnis 260/280 nm).
Durch Gelfiltration mit Sephadex G 200 und durch Adsorptionschromatographie ließ sich das Acrylamid nur zum Teil abtrennen (vergleiche auch LERCH und WOLF, 1971). Eine vollständige Reinigung des Proteins vom Acrylamid gelang durch erneute Elektrophorese in einer präparativen Kammer von WTW, bei der die Elektrophorese in Gelsäulen erfolgt (Für eine gelelektrophoretische Proteinauftrennung eignete sich dieses Gerät nicht). Trotz der eingesetzten sehr kurzen Gelsäule von 3 - 4 mm Länge war die Ausbeute mit ca. 20 % von der aufgegebenen Aktivität sehr gering.

Wurde für die präparative Plattengelelektrophorese das System nach DAVIS verwendet, so wurde aus der Hauptbande noch weniger aktives Enzym isoliert als bei dem System nach WILLIAMS und REISFELD. Die Aktivität des Enzyms der mittleren Bande ging beim Eluieren jedesmal verloren, sie konnte weder durch eine hohe Ionenstärke, noch durch KIV- (wie in der Hauptbande), L-Valin- oder L-Leucin-Zusatz, noch durch Temperaturen von 0^{o}-30^{o} C erhalten werden.

3. 12. 3 Re-Gelelektrophorese

Eine Re-Gelelektrophorese des Proteins der ersten Bande beim System nach WILLIAMS und REISFELD brachte in beiden Elektrophoresesystemen die gleiche Verteilung an Protein- und Aktivitätsbanden wie vorher (Tabelle 7). Wurde Protein aus der unteren Bande einer Re-Gelelektrophorese unterworfen, so konnte keine IPM-Synthase-Aktivität mehr nachgewiesen werden. Es entstand nur eine verschmierte Proteinbande, die sich über die Position der unteren aktiven Bande des ersten Laufes erstreckte.
Die Ergebnisse der Re-Gelelektrophorese zeigen, daß es sich bei dem von der Sephadex G 200-Säule eluierten Protein um gelelektrophoretisch reines Enzym handelte, das sich unter den Bedingungen der Gelelektrophorese

Tab. 7 R_F-Werte* der Proteinbanden in der Gelelektrophorese

System nach Davis (7 %iges Gel)			
Proteinbande	DTNB-Bande	Enzym von der DEAE-Cellulose-Säule	Gelelektrophoretisch aufgetrenntes Enzym (1. Bande)
H	1.	0,415	0,4
1. N	-	0,46	0,46
?	2.	0,57	-
2. N	-	0,62	0,62
3. N	3.	0,65	0,65

System nach Williams und Reisfeld (7,5 %iges Gel)			
Proteinbande	DTNB-Bande	Enzym von der DEAE-Cellulose-Säule	Gelelektrophoretisch aufgetrenntes Enzym (1. Bande)
H	1.	0,28	0,28
1. N	-	0,36	0,37
2. N	2.	0,46	0,46

* bezogen auf die Laufstrecke von Bromphenolblau
H = Hauptproteinbande, N = schwächere Nebenbande
Eingesetzt wurden jeweils 50 - 80 µg Protein pro 0,5 x 6,5 cm Gelröhrchen. Die Laufzeit betrug ca. 1 1/2 h bei 2,5 mA pro Röhrchen. Der Puffer war auf 10° C gekühlt und erwärmte sich während des Laufes auf ca. 15° C. Verwendet wurde die Trennkammer von Shandon.

zersetzte. Dabei begünstigten hohe pH-Werte und stärkere TRIS-Konzentrationen die Zersetzung. Das Protein der am langsamsten gewanderten Bande war anscheinend noch das vollständige Enzym, während die anderen Banden Untereinheiten oder Bruchstücke enthielten. Die verschiedenen Aktivitäts-

banden beruhten also nicht auf dem Vorhandensein von Isoenzymen.

3. 12. 4 Gelelektrophorese in Gegenwart von KIV und Effektoren

Nach KOHLHAW et al. (1969) entstanden bei der Gelelektrophorese der gereinigten IPM-Synthase aus S. typhimurium zwei, z. T. diffuse Banden. Durch Zusatz von L-Leucin ergab sich nur eine Bande (monomere Untereinheiten). Im Gegensatz dazu verhinderte L-Leucin bei der IPM-Synthase aus H 16 - A 81 nicht die Aufspaltung in mehrere Banden, ebenso nicht L-Valin, KIV oder KIV und L-Leucin bzw. L-Valin gemeinsam. Auch wurde die relative Lage der Banden zueinander durch die verschiedenen Zusätze nicht verändert.

3. 13 Andere Angewandte Methoden zur Proteinfraktionierung

Da im resuspendierten Niederschlag der Nukleinsäurefällung mit Protaminsulfat stets eine geringe IPM-Synthase-Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurde versucht, Protaminsulfat als spezifisches Reagenz zur Proteinfraktionierung einzusetzen. Eine weitgehende Abtrennung der Nukleinsäuren war durch eine Protaminsulfatlösung in Puffer (1 %ige Lösung, bis zu 2 mg Protaminsulfat/20 mg Protein) erfolgt. Durch eine anschließende Zugabe einer 2 %igen Lösung von Protaminsulfat Grad I in Wasser bis zu 8 mg Protaminsulfat / 20 mg Protein des Rohextraktes konnte das Enzym ausgefällt werden. Durch Resuspendieren in Ammoniumsulfatlösung (20 %ige Sättigung) erhielt man in 80 %iger Ausbeute ein 15-fach angereichertes Enzym. Bei der sich anschließenden Entsalzung (gedacht war auch an die Abtrennung von in Lösung gegangenem Protaminsulfat, MG ca. 3 000) mit Sephadex G 25 fiel das Protein aus. Das in Phosphatpuffer (0, 1 M KCl, L-Valin und KIV) auf-

genommene Protein wurde auf einer DEAE-Sephadex-Säule fraktioniert. Es wurde Enzym mit einer Aktivität von 9 000 E/g Protein in einer Ausbeute von 0,5 % erhalten, das aber nach dem Einengen in der Diaflokammer beim Verdünnen mit Phosphatpuffer ohne KCl-Zusatz wiederum ausfiel und dabei vollständig inaktiviert wurde. In der Ammoniumsulfatlösung war das Enzym bei 5 - 7° C über 10 Tage stabil (vergleiche III.4.2).
Das durch Protaminsulfat ausgefällte Enzym (bei einer KCl-Konzentration von 0,1 M in Lösung gehalten) ließ sich durch L-Leucin, auch bei hoher Inhibitorkonzentration, nur bis zu 30 % hemmen und durch L-Valin nur geringfügig wieder aktivieren, während sich Enzym aus dem Rohextrakt durch L-Leucin bis zu 90 % hemmen und durch L-Valin vollständig reaktivieren läßt.

Es wird angenommen, daß das basische Protaminsulfat von sauer reagierenden Gruppen am Enzym adsorbiert wird, und zwar so, daß das katalytische Zentrum aktiv bleibt, sich aber die allosterischen Eigenschaften verändern.

Bisher gelang es selbst durch hohe Ionenstärken nicht, das Protaminsulfat von der IPM-Synthase wieder abzutrennen, obwohl das so angereicherte Enzym und auch Enzym aus dem Rohextrakt KCl-Konzentrationen von über 2 M vertragen.
Da das eigentliche Ziel der Enzymanreicherung aber die Untersuchung der Substratspezifität der IPM-Synthase ist, sollte schon der Verdacht auf eine Änderung der Molekülstruktur die Verwendung von Protaminsulfat bei der Anreicherung verbieten.

Auch im Anschluß an die Ammoniumsulfatfraktionierung wurden verschiedene Anreicherungsmethoden auf ihre Anwendbarkeit für die IPM-Synthase geprüft. Es sollte erreicht werden, daß bei der Gelfiltration auf Sephadex G 150 nicht zu große Säulen verwendet werden mußten.
Die Verwendung von DEAE-Cellulose (bei 0 - 4° C) brachte auf dieser Anreicherungsstufe nur eine zweifache Anreicherung bei 10 % Ausbeute. Als ebenfalls nicht brauchbar erwiesen sich:

1. die Fällung mit Aceton und Äthanol wegen zu geringer Ausbeuten,
2. die Säurefällung bei 0° C, da die IPM-Synthase mit dem Hauptteil der Proteine im pH-Bereich von 5,2 bis 4,4 ausfiel,
3. die Adsorption an selbst hergestellten Phosphatgelen (bei 0 - 4° C), da die IPM-Synthase von Beginn der Gelzugabe an über einen großen Bereich der Phosphatgelzugabe adsorbiert wurde und dann nur unter großen Aktivitätsverlusten wieder desorbiert werden konnte,
4. die Chromatographie an Hydroxylapapit (bei 0 - 4° C), die bei 2,2-facher Anreicherung weniger als 10 % Ausbeute brachte,
5. die Chromatographie an CM-Cellulose und CM-Sephadex (0° und 25° C), da die IPM-Synthase bei pH-Werten von 6,5 und darüber selbst aus einem 10 mM Phosphatpuffer nicht adsorbiert wurde; bei kleineren pH-Werten wurde das Enzym inaktiviert,
6. die Gelfiltration bei Bedingungen, bei denen das Enzym in kleineren Einheiten vorliegt (in Gegenwart von L-Leucin zerfällt das Enzym aus S. typhimurium reversibel in Untereinheiten, KOHLHAW, 1969), da keine solchen Bedingungen gefunden wurden; so ergaben sich bei der Gelfiltration auf Sephadex G 150 bei 25° C in Gegenwart von L-Valin, KIV und KCl einerseits und L-Leucin andererseits nahezu identische Elutionsdiagramme (vergleiche dazu auch MG-Bestimmung in Gegenwart von L-Leucin),
7. die Ammoniumsulfatfraktionierung mit gleichzeitiger Adsorptionschromatographie an DEAE-Cellulose (bei 25° C) nach MAYHEW und HOWELL (1971); gegenüber der normalen Ammoniumsulfatfällung wurde bei gleichzeitig erhöhtem Arbeitsaufwand keine entscheidend bessere Anreicherung erzielt; die Adsorption bzw. Ausfällung des Enzyms war auf der Säule nicht quantitativ, sondern die Elution erfolgte in einem großen Konzentrationsbereich zusammen mit viel anderem, inaktivem Protein,
8. die Affinity-Chromatographie an Sepharose 4 B (bei 25° C) mit L-Valin oder L-Leucin, das über Hexandiamin, Dodecandiamin, Äthylendiamin oder direkt an die Matrix gebunden war. Es gelang nicht, das Enzym in

Tab. 8 Anreicherung der IPM-Synthase aus H 16 - A 81

Fraktion	Volumen (ml)	Gesamt-Protein (mg)	Spezif. Aktivität (E/g Prot.)	Gesamt-Anreicherung	Gesamt-Aktivität (E = µmole IPM geb./min)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	390	11 100	107	-	1 175	100
1. $(NH_4)_2SO_4$-Fällung (35 - 70 %ige Sättigung)	36,5	2 600	304	2,8	795	74,5
Sephadex G 150 eingeengt mit Diaflok	115	1 085	584	5,5	632	54
2. $(NH_4)_2SO_4$-Fällung (45 - 60 %ige Sättigung)	14	525	917	8,6	480	41
1. DEAE-Sephadex 2,5 mM L-Leucin pH= 7,2; eingeengt mit Aquazid	23,5	59	3 790	35,4	224	19
2. DEAE-Sephadex 4 mM L-Valin pH= 7,8; eingeengt mit Aquazid	17,5	15,4	6 830	63,9	105	9
DEAE-Cellulose 2,5 mM L-Leucin pH= 7,5; eingeengt mit Aquazid	2,05	2,65	11 700	109	31	2,6
Sephadex G 200	80	2,2	12 050	113	26,5	2,25

einem spezifischen Schritt zu eluieren; ein Teil des Enzyms war so fest gebunden, daß es nicht mehr in aktiver Form eluiert werden konnte. Das z.T. eluierte Enzym war aber nur um das 6-fache, bezogen auf den Rohextrakt, angereichert.

In Tab. 8 sind abschließend die bei der Anreicherung verwendeten Schritte noch einmal an Hand eines Fraktionierungsbeispiels angegeben.

4. Charakterisierung des Enzyms

4.1 Temperaturoptimum und Aktivierungsenergie

Für die Aktivitätsbestimmung des Enzyms wurde eine Temperatur von 30° C (WEBSTER et al., 1965; HILL, 1968; SAI et al., 1969) bzw. von 37° C (STRASSMAN et al., 1963; KOHLHAW et al., 1969; ULM et al., 1972; FISCHER, 1973) verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden die Aktivitätsbestimmungen routinemäßig bei 37° C durchgeführt; für die Angabe der spezifischen Aktivität der Rohextrakte und der gereinigten Fraktionen wurde als Inkubationstemperatur 30° C gewählt.

Um die Abhängigkeit der durch die IPM-Synthase katalysierten Reaktion von der Temperatur zu erfassen, wurde die Aktivität bei verschiedenen Temperaturen bestimmt. Das Temperaturoptimum für die angereicherte IPM-Synthase aus H 16 - A 81 lag bei 44° C, und zwar sowohl in TRIS/HCl-Puffer bei pH = 7,5 und pH = 8,1 wie auch in $(K,H)_3PO_4$-Puffer bei pH = 7,5 (Abb. 12 - 14).

Ebenfalls keinen Einfluß auf das Temperaturoptimum hatte die Substrat (Ac~SCoA-)Konzentration (Abb. 12).

Zwischen 45° C und 50° C sank die Aktivität des Enzyms stark ab, bei 60° C war es inaktiv. Wurde nach 5 Minuten der Testansatz mit beiden Substraten und dem Enzym von 65° C schnell auf 40° C abgekühlt, so erhielt

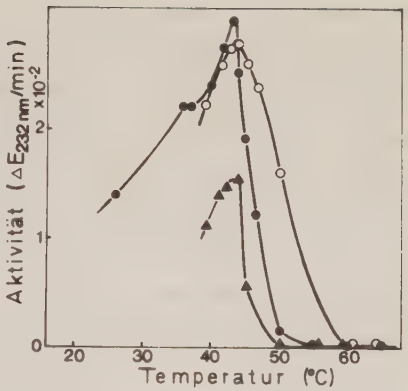


Abb. 12 Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Inkubationstemperatur

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im optischen Test bei E = 232 nm mit 250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 8,0, in einem Zeiss-Spektrophotometer PM QII mit temperierbaren Küvettenhaltern. Die Substratkonzentrationen betrugen: KIV = 0,75 mM, Ac~SCoA: 0,18 mM (-●-), 0,13 mM (-o-) und 0,045 mM (-▲-).

man nahezu die gleiche Aktivität wie im direkten Test bei 40° C. Daraus folgt, daß die Aktivitätsabnahme bei höheren Temperaturen durch eine reversible Denaturierung des Enzyms bedingt ist. In Abwesenheit des Substrates KIV reicht die Temperatur von 60° C aus, um eine irreversible Strukturänderung zu erreichen.

Aus den gemessenen Geschwindigkeiten bei den verschiedenen Temperaturen ($v_{max,T}$) läßt sich in der Auftragung nach der Arrhenius-Gleichung in der Schreibweise für eine enzymatisch katalysierte Reaktion:

$$\frac{d \ln v_{(max,T)}}{d T} = \frac{E_A^{br}}{RT^2} \quad \text{bzw.}$$

integriert:
$$\ln v_{(max,T)} = - \frac{E_A^{br}/R}{T} + \text{const.}$$

graphisch die Aktivierungsenergie für die Bruttoreaktion (E_A^{br}) bestimmen: Die Steigung $\frac{\ln v_{(max,T)}}{\Delta(\frac{1}{T})}$ der Kurve ergibt $\frac{E_A^{br}}{R}$. Die Aktivierungsenergie gibt die Energie an, die nötig ist, die thermodynamischen Energiebarrieren bei der Reaktion der Ausgangskomponenten (in diesem Fall von

KIV und Ac~SCoA) zum "aktivierten Übergangszustand" zu überwinden. Nach der "Theorie der absoluten Reaktionsrate" von EYRING sowie nach der kinetischen Gastheorie muß der so erhaltene Wert noch korrigiert werden (ULICH - JOST, 1962, S. 230 ff; DIXON und WEBB, 1964, S. 151 ff). Die Aktivierungsenthalpie ΔH berechnet sich daher nach $H = E_A^{br} - mRT$, wobei m von der Anzahl der Reaktionspartner und von dem Reaktionsmechanismus abhängt. Obwohl der ermittelten Größe E_A^{br} keine klare physikalische Bedeutung zukommt, da es sich bei den enzymkatalysierten Umsetzungen um komplexe Reaktionsfolgen handelt, ist die Bestimmung von E_A^{br} zur Charakterisierung wichtig. Im Fall der Katalyse ist die Höhe der Aktivierungsenergie auch von der Art des Katalysators, d.h. hier von der Eigenschaft des katalytischen Zentrums des Enzyms, abhängig. Bei enzymatischen Reaktionen können daher durch die Bestimmung der Aktivierungsenergie temperaturbedingte Konformationsänderungen sowie während der Anreicherung entstandene Defekte am katalytischen Zentrum erfaßt werden.
Die für die IPM-Synthase aus H 16 - A 81 bestimmte Aktivierungsenergie E_A^{br} beträgt für den Bereich von 28 - 35° C ca. 11 Kcal/Mol (Abb. 13/14), Tab. 9).

Tab. 9 Temperaturoptimum und Aktivierungsenergie für die IPM-Synthase unter verschiedenen Bedingungen

		pH = 7,5 TRIS/HCl-P.	pH = 7,5 $(K,H)_3PO_4$-P.	pH = 8,1 TRIS/HCl-P.
H 16 - A 81 Rohextrakt	T-Opt. (°C)	-	44	44
	E_A^{br} (kcal/Mol)	-	11,1	10,7
H 16 - A 81 gereinigtes Enzym	T-Opt. (°C)	44	44	44
	E_A^{br} (kcal/Mol)	9,5	10,7	10,4

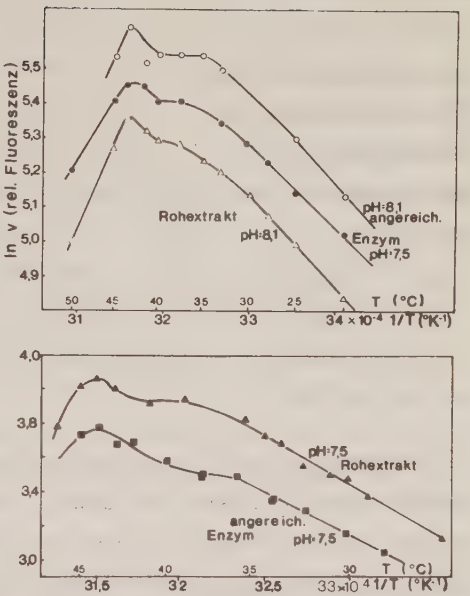


Abb. 13/14 Temperaturabhängigkeit der IPM-Synthase-Aktivität in der Arrhenius-Auftragung (Bestimmung der Aktivierungsenergie)

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im fluorimetrischen Test (s. Methoden), dabei wurde die Inkubationstemperatur wie in den Abbildungen angegeben variiert. Die Inkubationszeit betrug 50 min. Eingesetzt wurden der über Sephadex G 25 gelfiltrierte Rohextrat von H 16 - A 81 (Test mit 250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 8, 1 —△—; mit 250 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 7, 5 —▲—) sowie das bis zum Chromatographieschritt an DEAE-Cellulose angereicherte Enzym (Test mit 250 mM TRIS-HCl-Puffer, pH = 8, 1 —○—, pH = 7, 5 —●— und mit 250 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 7, 5 —■—). Die Kurven △/●/■ wurden parallel zur x-Achse verschoben, um eine übersichtliche Darstellung zu erhalten.

In TRIS/HCl-Puffer wurde im Vergleich zu $(K,H)_3PO_4$-Puffer ein niedrigerer E_A^{br}-Wert bestimmt. Die geringere Aktivierungsenergie wird jedoch nur vorgetäuscht, da TRIS/HCl-Puffer einen hohen Temperaturkoeffizienten (pH = 8, 14 bei 23° C → pH = 8, 0 bei 37° C für 0, 05 M Puffer; Data of Biochem. Research) hat, so daß sich bei der Temperaturerhöhung von 20° C auf 50° C der pH-Wert um ca. 0, 3 pH-Einheiten erniedrigt. Durch diesen pH-Abfall (s. pH-Optimum, 4. 3) werden bei höheren Temperaturen relativ zu niedrige Geschwindigkeiten gemessen und somit etwas zu niedrige E_A^{br}-Werte erhalten. $(K,H)_3PO_4$-Puffer hat dagegen einen dpH/dt = - 0, 0028 pH/°C (Handbook of Chemistry and Physics, 1968/69), so daß der pH-Abfall unbedeutend ist.

Ein Vergleich der Werte, die mit Rohextrakt und mit gereinigtem Enzym erhalten wurden, zeigt, daß das katalytische Zentrum während der Anreicherung unverändert geblieben ist. Dies ist wichtig für die Beurteilung der in III. 4. 8 beschriebenen Unspezifität der IPM-Synthase.
Die Bedeutung der Abweichung vom linearen Verlauf der Kurven in Abb. 13 und 14 sowie der Einfluß der Effektoren auf das Temperaturoptimum und die Aktivierungsenergie werden in III. 4. 15 gemeinsam behandelt.

4.2 Kältelabilität

Für die Stabilität eines Enzymproteins bzw. für seine Faltung in die aktive Tertiärstruktur sind neben der Bildung von Disulfidbrücken die hydrophilen und hydrophoben Wechselwirkungen bzw. Bindungen (nicht kovalente Bindungen) der Aminosäurereste von Bedeutung. Da die hydrophilen Bindungen, insbesondere die Wasserstoffbrückenbindungen, bei niedrigen Temperaturen und niedrigen Ionenstärken stabiler, die hydrophoben Wechselwirkungen dagegen durch geringe Temperaturen geschwächt, durch höhere Temperaturen und hohe Ionenstärken aber gestärkt werden, entscheidet u. a. das Vorhandensein vor hydrophoben bzw. hydrophilen Bindungen, bei welchen Temperaturen und bei welcher Ionenstärke die Proteinstruktur stabil ist.

Die meisten Enzyme sind in der Kälte stabil (DIXON und WEBB, 1964, S. 149) und werden häufig durch hohe Ionenstärken inaktiviert; bei diesen Proteinen sollten die hydrophilen Wechselwirkungen, zumindest aber nicht hydrophobe Bindungen, für die aktive Struktur entscheidend sein. Bei den kältelabilen, aber in der Wärme stabilen Enzymen wie z.B. der Glutamat-Decarboxylase (SHUKUYA und SCHWERT, 1960) oder der Fettsäure-Synthetase aus Taubenleber (KUMAR et al., 1972) sollte die Ausbildung der hydrophoben Bindungen für die aktive Struktur verantwortlich sein; auch könnte durch eine verstärkte Ausbildung hydrophiler Bindungen die aktive

Struktur in eine inaktive deformiert werden.

SMITH (1971) zeigte am Multienzymkomplex der Fettsäure-Synthetase aus Taubenleber den Einfluß hydrophober Wechselwirkungen auf die aktive Enzymstruktur. Mit Hilfe von D_2O konnte der kältelabile Komplex bei 0 - 4° C stabilisiert werden, da durch den Austausch von H_2O gegen D_2O in einer Proteinlösung die hydrophoben Wechselwirkungen verstärkt (LEE und BERN, 1968) werden.

Im Laufe der Enzymanreicherung zeigte sich, daß die IPM-Synthase aus H 16 - A 81 in der Kälte besonders instabil war. Um die Kältelabilität zu beweisen und nach der obigen Theorie zu prüfen, ob die hydrophoben Bindungen für die Stabilität dieses Enzyms eine Rolle spielen, wurde die gereinigte IPM-Synthase bei 0° C in $(K,H)_3PO_4$-Puffer mit niedriger und hoher Ionenstärke sowie mit steigendem Zusatz an D_2O inkubiert (Abb. 15).

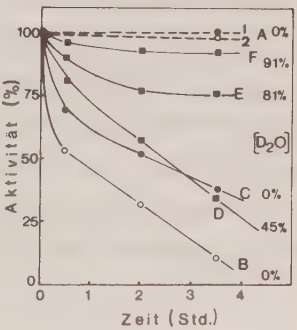


Abb. 15 Die Wirkung der Ionenstärke und von D_2O auf die Aktivität der IPM-Synthase bei 0° C

Die Enzymaktivität wurde im optischen Test bei 412 nm bestimmt. Die Inkubation erfolgte in $(K,H)_3PO_4$-Puffer bei pH = 7,5 im Eisbad bei 0° C. Die einzelnen Ansätze enthielten neben dem 70-fach angereicherten Enzym:

A_1	250 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer	-- Kontrolle bei Raumtemperatur
A_2	50 mM "	" " "
B	50 mM "	
C	250 mM "	
D	25 mM "	+ 45 % D_2O
E	25 mM "	+ 81 % D_2O
F	25 mM "	+ 91 % D_2O

Da die Aktivität der IPM-Synthase bei geringerer Ionenstärke in der Kälte rasch abnahm (Kurve B), durch höhere Ionenstärke (Kurve C) oder durch einen weitgehenden Ersatz von H_2O durch D_2O stabilisiert wurde (Kurven E und F), wird auf eine Kältelabilität, d.h. auf eine Strukturänderung auf Grund einer Verringerung der hydrophoben und/oder einer Verstärkung der hydrophilen Wechselwirkungen geschlossen.
Dieser Befund erklärt auch z.T. die Instabilität des Enzyms im Rohextrakt, die durch höhere Ionenstärke des Puffers nur z.T. verringert werden konnte. Der Rohextrakt mußte aber wegen der Proteasen-Aktivität, die durch die zugesetzten Inhibitoren nicht ganz unterbunden werden konnte, bei 0 - 4° C gehalten werden.
Auf Grund dieser Befunde wurde das gereinigte Enzym für kürzere Zeiträume in 250 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Da aber auch bei Raumtemperatur eine, wenn auch nur sehr langsame, Aktivitätsverminderung auftrat, wurde das Enzym für eine längere Lagerung in kleinen Portionen bei - 18° C möglichst schnell eingefroren, da sich im eingefrorenen Zustand die Aktivität nicht weiter verringerte. Zum Gebrauch wurde die IPM-Synthase im Wasserbad bei 37° C möglichst rasch aufgetaut; so erhielt man jeweils nahezu identische Proben. Durch das einmalige Einfrieren und Auftauen trat, wenn noch zusätzlich mit 0,2 mM KIV stabilisiert wurde, ein Verlust von ca. 20 % auf.

4.3 pH-Optimum

Die Bestimmung des pH-Optimums erfolgte mit über Sephadex G 25 gelfiltriertem Rohextrakt im fluorimetrischen Test und mit ca.110fach angereichertem Enzym im optischen Test bei 232 nm (Abb. 16).
In Phosphatpuffer wurde die höchste Aktivität bei einem pH-Wert von pH = 8,2, in TRIS/HCl-Puffer zwischen pH = 8,2 und pH = 8,7 gemessen. Dabei unterschieden sich die Werte vom Rohextrakt und vom angereicherten

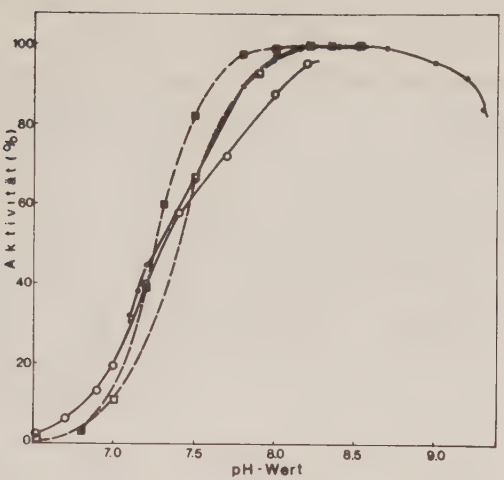


Abb. 16 Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Wasserstoffionenkonzentration

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte bei 37° C im fluorimetrischen Test (s. Methoden). Der Test wurde mit gelfiltriertem Rohextrakt von H. eutropha H 16 - A 81 (Sephadex G 25; 1,2 mg Protein/ml Test) gestartet.

—■— TRIS/HCl-Puffer, 250 mM, 250 mM KCl

—□— $(K,H)_3PO_4$-Puffer, 250 mM;

dabei entsprechen 100 % 150 rel. Fluoreszenzeinheiten.

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte bei 30° C im optischen Test (s. Methoden). Der Test wurde mit angereichertem Enzym (ca. 110fach); 4,2 µg Protein/ml Test) gestartet.

— o — $(K,H)_3PO_4$-Puffer, 250 mM

—●— TRIS/HCl-Puffer, 250 mM;

dabei entsprechen 100 % einem ΔE_{232} nm/min = 0,25.

KIV = 0,75 mM; Ac~SCoA = 0,188 mM.

Enzym kaum, was wiederum ein Hinweis darauf ist, daß durch die Anreicherungsschritte die Proteinstruktur bezüglich des katalytischen Zentrums nicht verändert wurde.

Neben der Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert interessierte auch die

Abhängigkeit der Stabilität des aktiven Enzyms. Das auf 7 000 E/g Protein angereicherte Enzym wurde bei Raumtemperatur und verschiedenen pH-Werten inkubiert und nach 1, 15, 60 und 180 Minuten im optischen Test bei pH = 8,1 auf die Restaktivität geprüft (Abb. 17).

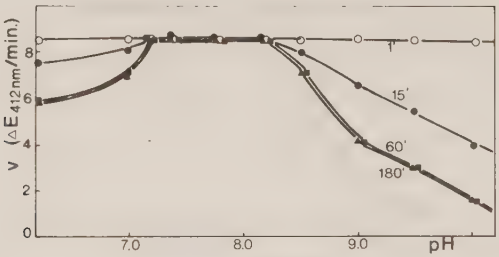


Abb. 17 Inaktivierung der IPM-Synthase in Abhängigkeit von der Zeit und vom pH-Wert

Die Inkubation erfolgte in 50 mM $(K,H)_3PO_4$ /TRIS/HCl-Puffer mit angegebenem pH-Wert bei Raumtemperatur; nach 1 min —○—, 15 min —●—, 60 min —■—, 180 min —▲— wurde ein Aliquot entnommen und zum Aktivitätstest im optischen Test mit DTNB in 250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 8,1 bei 30° C eingesetzt.

Es ergab sich, daß das Enzym ohne Zusätze nur im pH-Bereich von pH = 7,2 bis pH = 8,2 längere Zeit stabil war. Durch den Zusatz von 2 mM KIV oder 10 mM L-Valin blieb die Aktivität des Enzyms auch im pH-Bereich unter 7,2 und bis 8,5 erhalten, während L-Leucin die Instabilität in diesem pH-Bereich verstärkte (s. III. 4. 13). Die Ergebnisse zeigten, daß das Enzym am besten bei pH = 7,8 aufbewahrt werden sollte, da in diesem Bereich pH-Verschiebungen, z.B. beim Einfrieren der Enzymlösung, keinen Einfluß auf die Stabilität des Enzyms haben. Außerdem sollte dabei nach Möglichkeit KIV oder L-Valin zur Stabilisierung zugesetzt werden.

4.4 Isoelektrischer Punkt

Mit Hilfe des Isoelektrischen Punktes (pI) kann man eine Aussage darüber machen, ob mehr basische oder mehr saure Aminosäuren im Enzym vorhanden sind. Die meisten Enzyme bestehen aus ungefähr gleichen Anteilen an basischen und sauren Aminosäuren, so daß der Isoelektrische Punkt um den Neutralbereich liegt (MAHLER und CORDES, 1961, S. 53).
Der Isoelektrische Punkt läßt sich bei Kenntnis der Aminosäuresequenz berechnen, oder aber, wenn die Zusammensetzung des Enzyms unbekannt ist, durch Elektrofokussing experimentell bestimmen.
Für die IPM-Synthase wurden in der Literatur bisher noch keine pI-Werte angegeben.
Die Reaktionen der IPM-Synthase aus H 16 - A 81 mit Protaminsulfat und Cytochrom c deuteten daraufhin, daß das Enzym stark saure Gruppierungen an der Außenfläche besitzen muß.

Die Fokussierung (s. Methoden 11.5) der IPM-Synthase erfolgte in 5 parallelen Gelröhrchen mit einer Ampholyt (Ampholin-LKB)-lösung für einen Gradienten von pH = 10 bis pH = 3 und weiteren 5 parallelen Gelröhrchen für einen Gradienten von pH = 6 bis pH = 3. Je zwei der Gelröhrchen wurden nach der Fokussierung in kleine Scheiben geschnitten; in diesen wurde jeweils die IPM-Synthase-Aktivität und der pH-Wert bestimmt.
Je ein weiteres Gelröhrchen wurde mit 1,25 M $(K,H)_3PO_4$-Puffer (pH = 8,2) äquilibriert und in 2 ml Testlösung mit DTNB zur spezifischen Anfärbung der IPM-Synthase im Gel inkubiert. Es trat nur eine Aktivitätsbande auf. Nach Anfärbung mit Coomassie Blue war an der Stelle der markierten Aktivitätsbande die Hauptproteinbande zu finden. Daneben lagen noch drei weitere, schwächere Proteinbanden. Die Hauptproteinbande war schon vor dem Anfärben in durchfallendem Licht als opaleszierende Zone erkennbar. Aus je einem weiteren Gelröhrchen wurde sie herausgeschnitten und eluiert. Der pH-Wert betrug pH = 3,9. Bei den in Scheiben geschnittenen Gelen ergab sich für die Fraktion mit hoher IPM-Synthase-Aktivität der gleiche pH-Wert:

3.92 ± 0,03, und zwar sowohl bei der Verwendung der Ampholinlösung für den pH-Bereich von 3 - 10 als auch bei der für den Bereich pH = 3 bis pH = 6.

Da eine Dissoziation der geladenen Gruppen am Protein und damit der pI-Wert von der Ionenstärke des Lösungsmittels abhängig ist, wird der pI-Wert der IPM-Synthase aus H. eutropha H 16 - A 81 mit 3,9 - 4,0 angegeben. Die Vermutung, daß dieses Enzym mehr saure als basische Aminosäuren enthält, wurde somit bestätigt. Mit diesem Befund wird auch die Vermutung, daß die IPM-Synthase im Rohextrakt an basische Proteine adsorbiert wird (III. 3. 2), unterstützt.

4. 5 Molekulargewichtsbestimmung

Das Molekulargewicht der IPM-Synthase aus H 16 - A 81 wurde nach zwei indirekten, voneinander unabhängigen Methoden ermittelt:

a) durch Gelfiltration mit Sephadex G 200 in Gegenwart von Referenzproteinen (ACKERS, 1964; OEDING, 1972)

und

b) über die Bestimmung der Svedbergkonstanten durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (MARTIN und AMES, 1961; OEDING, 1972).

4. 5. 1 Sephadex G 200 - Gelfiltration

Die Bestimmung des Molekulargewichtes durch Gelfiltration beruht auf der behinderten Diffusion von Proteinen in einer Gelmatrix (Sephadex G 200). In erster Näherung ist diese Diffusion und damit die Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins im Gel von dem Molekulargewicht des Proteins abhängig. Mit Hilfe von Referenzproteinen mit bekanntem Molekulargewicht läßt

sich aus der graphischen Auftragung der Elutionsvolumina gegen den Logarithmus der Molekulargewichte das unbekannte Molekulargewicht bestimmen.

Für die Bestimmung wurde die ca. 100fach angereicherte IPM-Synthase verwendet; als Referenzproteine wurden Katalase (MG = 240 000), Aldolase (MG = 147 000), Rinderserumalbumin (MG = 69 000) und Albumin aus Hühnerei (MG = 45 000) eingesetzt. Die sonst oft benutzten Proteine Chymotrypsinogen A (enthielt ca. 2 % aktives Enzym) und das basisch reagierende Cytochrom c konnten nicht verwendet werden, da sie sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 0° C die IPM-Synthase innerhalb von 30 Minuten bis auf 25 % Restaktivität inaktivierten.
Die IPM-Synthase wurde zwischen der Aldolase und dem Rinderserumalbumin eluiert (Abb. 18). Daraus ergibt sich ein Molekulargewicht von 115 000 (Abb. 20).

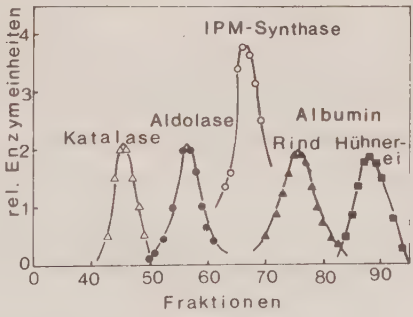


Abb. 18 Elutionsdiagramm eines Gemisches aus Referenzproteinen und der IPM-Synthase zur MG-Bestimmung auf Sephadex G 200 superfine

Die Säulenabmessung betrug 1,5 cm ⌀ und 62 cm Länge, die Temperatur 23° C. Die Säule war mit 50 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer 200 mM KCl und 0,1 mM KIV, pH = 7,5, äquilibriert.
Es wurden Fraktionen von 15 Tropfen aufgefangen.

4. 5. 2 Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

Der Molekulargewichtsbestimmung eines Proteins über die Svedberg-Konstante ($S_{20\omega}$) mit Hilfe der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

iegt die Annahme zugrunde, daß die Sedimentationsrate eines Makromoleküls
ine Funktion des Molekulargewichtes und der Form ist und daß die Proteine
m Gradienten mit gleichbleibender Geschwindigkeit wandern. Verschiedene
Proteine beeinflussen sich dabei gegenseitig nicht, so daß das Verhältnis
der Entfernung vom Meniskus sich während des Wanderns durch den Gra-
dienten nicht ändert (MARTIN und AMES, 1961). So können aus der relati-
ven Lage der Banden bei Kenntnis der Svedbergkonstante eines Proteins
die Konstanten für andere Proteine errechnet werden:

$$\frac{\text{Wanderungsstrecke des Standards}}{\text{Wanderungsstrecke der Probe}} = \frac{S_{20\omega}\,\text{Standard}}{S_{20\omega}\,\text{Probe}}$$

Nach SCHACHMANN (1959) sind die Svedbergkonstanten und die Molekular-
gewichte zweier Proteine durch die Beziehung

$$\frac{S_{20\omega}\,\text{Standard}}{S_{20\omega}\,\text{Probe}} = \frac{\text{MG Standard}}{\text{MG Probe}}$$

miteinander verknüpft.

Für die Molekulargewichtsbestimmung nach dieser Methode wurde das von
der Sephadex G 200-Säule eluierte Enzym (III. 4. 5. 1), nach erneuter Einengung
mit Aquazid I, verwendet.

Als Referenzprotein diente Katalase ($S_{20\omega} = 11,3 \times 10^{13}$) und als Kontroll-
protein Aldolase. Für die IPM-Synthase wurde ein Molekulargewicht von
114 300 und eine Svedbergkonstante von $S_{20\omega} = 6,88 \times 10^{13}$, für die Aldo-
lase ein Molekulargewicht von 149 000 und eine Svedbergkonstante von
$S_{20\omega} = 8,25 \times 10^{13}$ ermittelt. Das für die Aldolase ermittelte Molekularge-
wicht weicht um weniger als 2 % vom Literaturwert (147 000, Boehringer
Katalog 1973) ab und liegt somit in einem vertretbaren Fehlerbereich. Das
Molekulargewicht für die IPM-Synthase (115 000 bzw. 114 300) stimmt nach
beiden Methoden gut überein.

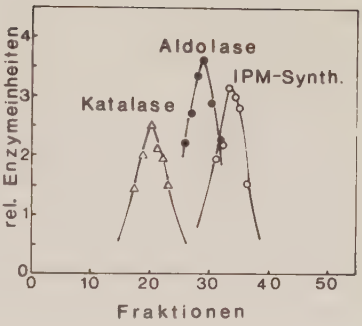


Abb. 19 Sedimentation der IPM-Synthase und der Referenzproteine Katalase und Aldolase in einem linearen Saccharose-Gradienten (7 - 35 % w/w)

5,4 ml eines linearen Saccharose-Gradienten (7 - 35 % w/w) in 50 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 7,4 mit 500 mM KCl und 1 mM KIV wurden mit 100 µl des Enzymgemisches überschichtet und 17 h bei 4 063 rad/sec zentrifugiert. Der Gradient wurde durch Anstechen der Zentrifugenröhrchen in 4 Tropfen-Fraktionen entnommen.

4.5.3 Molekulargewichtsbestimmung in Gegenwart von L-Leucin

Sowohl bei der Gelfiltration als auch im Saccharose-Dichtegradienten war dem Enzym und dem Puffer 0,1 mM KIV zur Stabilisierung der Enzymaktivität zugesetzt worden. Abweichend davon wurde eine weitere Bestimmung des Molekulargewichtes durch Gelfiltration auf Sephadex G 200 in Abwesenheit von KIV und in Gegenwart von L-Leucin durchgeführt. Obwohl das Enzym aus derselben Anreicherung stammte, ergab sich jetzt ein Molekulargewicht von 100 000 (Abb. 20).

Da die Elution auch von der Molekülgestalt abhängt, weist dieser Befund daraufhin, daß L-Leucin eine Konformationsänderung des Enzyms bewirkt. Auszuschließen ist dadurch, daß bei der IPM-Synthase aus H 16 - A 81 parallel zur Leucinhemmung eine Dissoziation in Untereinheiten erfolgt, wie es bei dem Enzym aus S. typhimurium gefunden wurde (KOHLHAW und BOATMAN, 1971). Dieser Befund stimmt mit den Experimenten der Anreicherung überein: es wurden keine Bedingungen gefunden, bei denen eine Verschiebung oder Aufspaltung der Enzymaktivität während der Gelfiltration auf Sephadex G 150 (2,5 ø x 100 cm) erhalten wurde.

Eine ähnlich geringe Änderung des Molekulargewichtes wie bei der IPM-Synthase aus H 16 - A 81 fanden ULM et al. (1972) bei dem Enzym aus Saccharomyces spec.

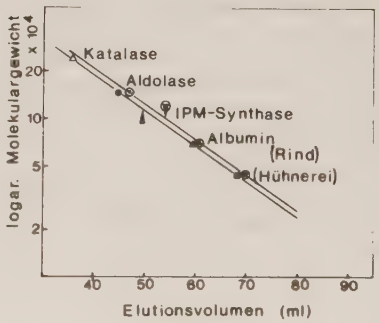


Abb. 20 Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration auf Sephadex G 200 superfine: Auftragung der Elutionsvolumina gegen den Logarithmus der bekannten Molekulargewichte
Daten wie unter Abb. 18.
– ●– in Gegenwart von 0,1 mM KIV und 200 mM KCl, – ◉ – in Gegenwart von22,5 mM L-Leucin und 10 mM KCl

4.5.4 SDS-Gelelektrophorese

Um festzustellen, ob die IPM-Synthase aus Untereinheiten besteht, wurde, zusammen mit Eichproteinen, eine SDS-Gelelektrophorese in der Plattenelektrophoresekammer nach STEGEMANN durchgeführt (s. Methoden).
Dazu wurde die durch präparative Gelelektrophorese gereinigte IPM-Synthase verwendet. Als Vergleichsproteine dienten: Cytochrom c (MG = 13 500), Chymotrypsinogen A (MG = 25 000), Albumin aus Hühnerei (MG = 45 000) und Rinderserumalbumin (MG = 69 000). (Die Proben wurden räumlich getrennt von einander aufgetragen.) Das Protein der IPM-Synthase wurde über einen größeren Bereich (zwischen Cytochrom c und Chymotrypsinogen A) verteilt, bei gleichzeitig scharfen Banden für die Referenzproteine.
Das Ergebnis zeigt, daß die IPM-Synthase aus mehreren Polypeptidketten (evt. 6) bestehen muß, ohne daß bisher genauere Angaben darüber gemacht werden können, ob es sich um identische oder verschiedene Untereinheiten handelt.

4.6 SH-Gruppen und Disulfidbrücken im Protein

4.6.1 Einfluß von SH-Reagenzien

Bei den Versuchen zur Stabilisierung der IPM-Synthase im Rohextrakt und beim angereicherten Enzym verhinderte Mercaptoäthanol weder bei Raumtemperatur noch bei 0° C die Inaktivierung sondern verstärkte sie, insbesondere bei 0° C und in Gegenwart von 2,5 mM L-Leucin (Tab. 10 A).
Um den Einfluß der Kältelabilität auszuschließen, wurde die Wirkung von SH-Reagenzien auf die gereinigte IPM-Synthase bei Raumtemperatur geprüft (Tab. 10 B).

Tab. 10 Einfluß von SH-Reagenzien auf die Enzymstabilität

A

Zusatz	(0° C) Inkubationszeit 1 min		(0° C) Inkubationszeit 24 h	
	rel. Fluoreszenzeinh. / 20 min	% Restaktivität	rel. Fluoreszenzeinh. / 20 min	% Restaktivität
ohne	150	100	100	67
7 mM Mercaptoäthanol	154	102	-	-
14 mM "	115	77	-	-
70 mM "	102	68	-	-
2,5 mM L-Leucin	74,5	50	19	12,5
14 mM Mercaptoäthanol + 2,5 mM L-Leucin	58	38	5	3
14 mM Mercaptoäthanol + 2,5 mM L-Leucin + 5 mM L-Valin	89	59	29	20

Verwendet wurde ein 5fach angereichertes Enzym (495 E/g Protein). Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im fluorimetrischen Test (37° C). Die Inkubationszeit des Testansatzes betrug 20 min; TRIS-HCl-Puffer, pH = 8,1 (s. Methoden).
Die Inkubation erfolgte in 50 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer bei pH = 7,5 mit 100 mM KCl und SH-Reagenzien wie angegeben bei 6 - 8° C.

B

Zusatz	Inkubationszeit bei 23 °C					
	1 Minute		1 Stunde		15 Stunden	
	$\frac{\Delta E_{412nm}}{min}$ ($\times 10^{-2}$)	% Restaktivität	$\frac{\Delta E_{412nm}}{min}$ ($\times 10^{-2}$)	% Restaktivität	$\frac{\Delta E_{412nm}}{min}$ ($\times 10^{-2}$)	% Restaktivität
ohne	5,5	100	-	-	5,5	100
2 mM Mercaptoäthanol	5,2	93	4,2	71	3,2	49
2 mM Glutathion, red	5,0	90	4,5	82	3,5	55
2 mM Glutathion, ox.	5,5	100	-	-	5	90
2 mM Cystein (-SH)	4,2	71	4,0	67	2,5	33
2 mM Cystin (-SS-)	5,0	90	5,0	90	5,0	90
2 mM Thioglucolat	5,5	100	-	-	4,0	67
2 mM Dithiothreitol	4,2	71	3,2	49	3,2	49
2 mM DTNB	5,5	100	5,2	93	4,0	67
2 mM DTNB + 1 mM KIV	5,5	100	-	-	5,5	100
10 mM Cystin (-SS-)	2,7	50	-	-	-	-
10 mM Cystin (-SS-) + $4,5 \times 10^{-4}$ M Ac~SCoA	3,9	70	-	-	-	-

Verwendet wurde ein ca. 100fach angereichertes Enzym (11 900 E/g Protein). Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im opt. Test mit DTNB; KIV = 1,5 mM, Ac~SCoA = 0,9 mM, TRIS/HCl-Puffer, pH = 8,0 (s. Methoden). Die Inkubation erfolgte in 250 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 7,5 und den Reagenzien wie angegeben bei 23° C.

Alle Substanzen mit freier SH-Gruppe setzen die Aktivität des Enzyms schon innerhalb einer Stunde auf 50 - 80 % derjenigen der Kontrollproben herab. Die Disulfidverbindungen zeigten dagegen nur einen geringen Effekt. Oxydiertes Glutation und Cystin führten im Laufe von 15 Stunden zu einer 10 %igen Aktivitätsminderung. Nur DTNB hatte nach 15 Stunden das Enzym stärker, auf 67 % Restaktivität, inaktiviert, obwohl es nach einer Inkubationszeit von 1 Minute keine Veränderung bewirkt hatte. Der Aktivitätsverlust nach längerer Inkubation konnte durch gleichzeitige Zugabe von 1 mM KIV

verhindert werden. Durch Ac~SCoA konnte auch der durch Cystin bewirkte Aktivitätsverlust verringert werden. Die Befunde deuten auf einen Angriff der Reagenzien am katalytischen Zentrum hin.

Die Beeinträchtigung des Enzyms durch die SH-Reagenzien, die sonst zur Stabilisierung von freien SH-Gruppen eingesetzt werden, läßt vermuten, daß bei der IPM-Synthase aus H 16 - A 81 keine für die Stabilität der Struktur und des katalytischen Zentrums "essentiellen" freien SH-Gruppen vorhanden sind. Diese Schlußfolgerung steht auch mit der Wirkungslosigkeit von Mercuribenzoat (2×10^{-5}M) im optischen Test im Einklang. Im übrigen war die Abwesenheit von essentiellen SH-Gruppen auch die Voraussetzung für die Anwendung des optischen Tests mit DTNB.
Man kann annehmen, daß die SH-Reagenzien die Disulfidbrücken im Protein angreifen (ROBYT et al., 1971) und dadurch die Struktur des Enzyms verändern. Auch der Angriff auf Metall-S-Bindungen im katalytischen Zentrum könnte eine Rolle spielen (s. III.4.14).

4.6.2 SH-Gruppen-Titration

Eine vollständige Abwesenheit von freien SH-Gruppen bei dem IPM-Synthaseprotein aus H. eutropha H 16 - A 81 wurde durch eine SH-Gruppen-Titration mit DTNB (ELLMAN, 1959; ROBYT et al., 1971) am hochgereinigten Enzym (11 980 E/g Protein, bei 1 mg Protein / 0,56 ml Testvolumen) nachgewiesen. Es wurde mit DTNB selbst nach einer Inkubation von mehr als 30 Minuten keine Extinktionsänderung erhalten.
Das Vorhandensein mehrerer Disulfidbrücken bzw. maskierter SH-Gruppen im Protein wurde nach ROBYT et al. (1971) durch alkalische Reaktion mit DTNB nachgewiesen (s. Methoden). Da im Versuch eine zu hohe Extinktionsänderung erhalten wurde, war eine quantitative Auswertung nicht möglich.

4.7 Aufnahme der Substratsättigungskurven

Da die IPM-Synthase zwei Substrate - α-Ketoisovaleriansäure (KIV) und Acetyl-Coenzym A (Ac~SCoA) - benötigt, mußten für die einzelnen Substrate getrennte Sättigungskurven aufgenommen werden, wobei das eine Substrat variiert und das andere Substrat konstant gehalten wurde.

4.7.1 Substrat(KIV)-Sättigung

Die Substrat(KIV)-Sättigungskurve wurde bei verschiedenen Ac~SCoA-Konzentrationen aufgenommen. Die Konzentration von KIV wurde von 0,003 mM bis z.T. zu 20 mM variiert. Die Auftragung der Aktivität gegen die Substratkonzentration ergab in erster Näherung eine hyperbolische Kurve (Abb. 21 A). Bei Vernachlässigung der aufgetretenen Abweichungen läßt sich aus der Lineweaver-Burk-Auftragung (1/V gegen 1/s) ein gemittelter K_m-Wert von 6×10^{-5} M ablesen (Abb. 21 B). Die Lineweaver-Burk-Auftragung kann auch für die Substratsättigung von Enzymen mit mehr als einem Substrat angewendet werden, wenn die Reaktion nahezu irreversibel verläuft, wie man es für die IPM-Synthase annehmen kann, und die nicht variierten Substrate in der Sättigung vorliegen.

Die aufgetretenen Abweichungen von einer Michaelis-Menten-Kinetik liegen außerhalb der Fehlerbreite des angewendeten Tests. Um festzustellen, ob die Abweichungen evtl. auf einer Artefaktreaktion des etwas "unphysiologischen" TRIS/HCl-Puffers beruhten (KAPOOR und TRONSGARD, 1972), wurde die Substratsättigung in $(K,H)_3PO_4$-Puffer und unter verschiedenen Bedingungen erneut geprüft.

Die erhaltenen Substrat(KIV)-Sättigungskurven unter Verwendung von $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 8,1, zeigten erneut die gleiche Art der Abweichungen von einer Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 22 A/B/C). Auch durch einen pH-Wechsel von pH = 8,1 auf 7,65 wurde keine einfachere Substratsättigungskurve erhalten (Abb. 23). Entsprechendes gilt für eine Tempera-

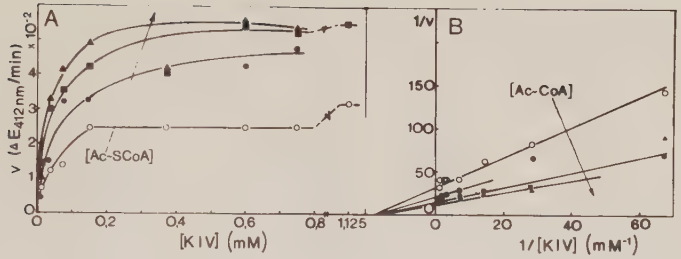


Abb. 21 Abhängigkeit der Aktivität der IPM-Synthase von der Substrat(KIV)-Konzentration bei vier verschiedenen Substrat(Ac~SCoA)-Konzentrationen

A: Substrat(KIV)-Sättigung in TRIS/HCl-Puffer, bei pH = 8,1 und 30° C. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im DTNB-Test (s. Methoden). Die Substrat(KIV)-Konzentration wurde wie angegeben variiert; Ac~SCoA: 0,094 mM (—○—); 0,188 mM (—●—); 0,376 mM (—■—); 0,564 mM (—▲—).

B: Lineweaver-Burk-Auftragung zu Abb. 21 A

turerhöhung von 30° C auf 40° C (Abb. 24).

Durch den pH-Wechsel änderte sich die Substrathemmung: KIV-Konzentrationen über 1 mM ergaben bei pH = 8,1 sowohl in TRIS/HCl- als auch in $(K,H)_3PO_4$-Puffer eine Hemmung; die Aktivität sank auf ca. 80 % der maximalen Geschwindigkeit ab (Abb. 22/24). Bei pH = 7,65 dagegen wurde bis zu 1,5 mM KIV keine Substrathemmung gemessen.

In Tab. 11 sind die K_m-Werte, die für die verschiedenen Bedingungen aus den Annäherungsgeraden über den gesamten Sättigungsbereich im Lineweaver-Burk-Diagramm erhalten wurden, wiedergegeben. Sie entsprechen weitgehend den $K_{0,5}$-Werten, die aus den v/s -Diagrammen abgelesen werden können.

Abb. 22 Abhängigkeit der Aktivität der IPM-Synthase von der Substrat(KIV)-Konzentration bei 2 verschiedenen Substrat-(Ac~SCoA)-Konzentrationen in $(K,H)_3PO_4$-Puffer bei pH = 8,1 und 30° C

A: Substrat(KIV)-Sättigungskurve im Bereich bis 0,6 mM

B: Substrat(KIV)-Sättigungskurve im Bereich bis 20 mM

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im DTNB-Test (s. Methoden).

C: Lineweaver-Burk-Auftragung zu Abb. 21A / 21B

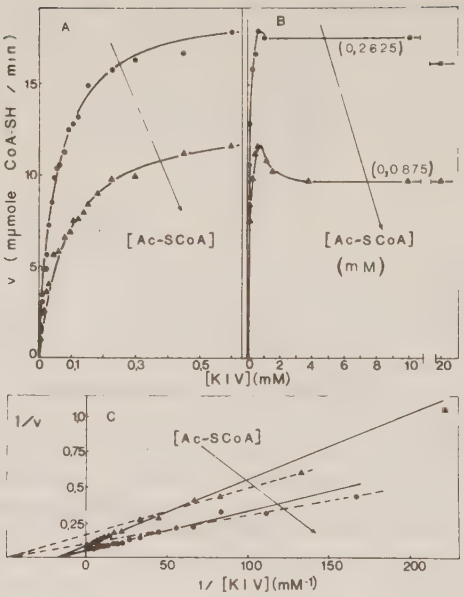
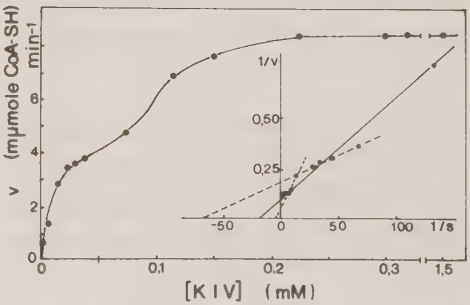


Abb. 23 Abhängigkeit der Aktivität der IPM-Synthase von der Substrat(KIV)-Konzentration in TRIS/HCl-Puffer bei pH = 7,65 und 30° C

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im optischen Test durch Verfolgen der Extinktionsänderung bei 232 nm. Die Substrat-(Ac~SCoA)-Konzentration betrug 0,15 mM. Substrat-KIV wurde wie angegeben variiert.



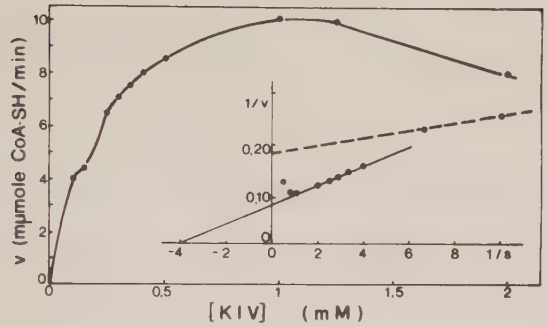


Abb. 24 Abhängigkeit der Aktivität der IPM-Synthase von der Substrat-(KIV)-Konzentration bei 40° C

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte in DTNB-Test mit TRIS/HCl-Puffer, 250 mM, pH = 8,0 in Gegenwart von 250 mM KCl. Die Substrat(Ac~SCoA)-Konzentration betrug 0,035 mM

Tab. 11 Gemittelte K_m-Werte für das Substrat KIV bei unterschiedlichen Testbedingungen

Testpuffer	pH-Wert	Temperatur (° C)	gemittelter K_m-Wert (M)
TRIS/HCl 250 mM + 250 mM KCl (Abb. 24)	8,0	40	$2,5 \times 10^{-4}$
TRIS/HCl 250 mM (Abb. 21 A/B)	8,1	30	6×10^{-5}
TRIS/HCl 250 mM (Abb. 23)	7,65	30	5×10^{-5}
$(K,H)_3PO_4$ 250 mM (Abb. 22)	8,1	30	6×10^{-5}

Bei Berücksichtigung der Abweichungen erhält man Kurven mit dazwischen liegenden Plateaus, sogenannte "bumpy curves" (TEIPEL und KOSHLAND, 1969), die auch für verschiedene andere Enzyme beschrieben wurden. Es können z.T. mehrere K_m-Werte angegeben werden (s. gestrichelte Kurven in den Abb.). Bei pH = 7,65 (Abb. 23) ergeben sich deutlich zwei

K_m-Werte: 2×10^{-4} M für hohe KIV-Konzentrationen und $1,4 \times 10^{-5}$ M für mittlere Substratsättigungskonzentrationen.

Auch bei pH = 8,1 sind mehrphasische Sättigungskurven, vor allem bei niedrigen Konzentrationen des zweiten Substrates, erkennbar. So läßt sich für den mittleren Substratsättigungsbereich in Abb. 22 C ein K_m-Wert von 2×10^{-5} M KIV angeben.

Eine Deutung der erhaltenen Substratsättigung ist auf Grund der Hill-Auftragung möglich. Trägt man die Daten aus Abb. 22 ($(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 8,1) nach der Hill-Gleichung auf (Abb. 25), so ergibt sich zwar keine einheitliche Gerade, aber die erhaltenen Kurven lassen zumindest drei größere Bereiche erkennen: für geringe KIV-Konzentrationen ($< 1 \times 10^{-5}$ M) mit einem Hill-Koeffizienten $n_H \geq 1$, für mittlere KIV-Sättigungskonzentrationen (10^{-5} - 10^{-4}M) mit $n_H < 1$ und für hohe KIV-Konzentrationen ($> 2 \times 10^{-4}$ M) mit $n_H > 1$.

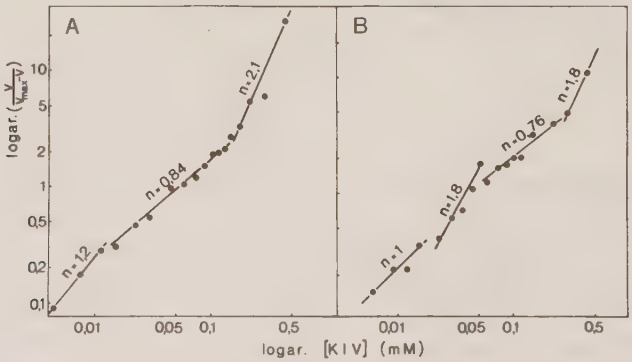


Abb. 25 Hill-Auftragung zu Abb. 22A

A: für Ac~SCoA = 0,0875 mM B: für Ac~SCoA = 0,26 mM

Das Substrat KIV zeigt also homotrope Effekte.

Nach LEVITZKI und KOSHLAND (1969) sind Substratsättigungskurven mit $n_H > 1$ und parabelförmigem Kurvenverlauf in der Lineweaver-Burk-Auftragung

durch eine positive, Substratsättigungskurven mit $n_H < 1$ und hyperbolischem Kurvenverlauf durch eine negative Kooperativität zu erklären.

Danach zeigt das Substrat KIV sowohl positive als auch negative kooperative Effekte. LEVITZKI und KOSHLAND (1969) zeigten an der CTP-Synthase, daß Kurven mit einem dazwischen liegenden Plateau oder Maximum durch positive und negative Kooperativität für den gleichen Liganden erhalten werden (vgl. auch Diskussion). Unter der Annahme einer substratinduzierten Konformationsumwandlung muß man für die IPM-Synthase fordern, daß durch die Bindung des ersten Substrat(KIV)-Moleküls am Enzym die Bindung des zweiten erleichtert wird (positive Kooperativität), welches dann aber die Bindung des nächsten erschwert (negative Kooperativität); dies erleichtert, wenn es aber gebunden ist, wiederum die Bindung eines weiteren Substrat(KIV)-Moleküls (positive Kooperativität).

Bei der rein negativen Kooperativität sollte der Quotient aus der Substratkonzentration für 90 % und für 10 % der Maximalgeschwindigkeit größer als 81 sein

$$R_S = \frac{(S)_{90\ \%\ V_{max}}}{(S)_{10\ \%\ V_{max}}} > 81$$

(Die theoretischen Werte für R_S ergeben sich mathematisch aus der Michaelis-Menten-Gleichung sowie der Hill-Gleichung; dabei entspricht ein $R_S = 81$ einer Michaelis-Menten-Kinetik, ein $R_S < 81$ einer positiven und ein $R_S > 81$ einer negativen Kooperativität.)

Aus Abb. 22 ergaben sich R_S-Werte von 55 bzw. 58, je nach der Konzentration des zweiten Substrates Ac~SCoA.

Da bei der Berechnung der R_S-Werte aber die Bereiche mit zugrunde liegen, in denen nach der Hill-Auftragung positive Kooperativität anzunehmen ist, schließen die niedrigen R_S-Werte die Möglichkeit einer negativen Kooperativität für den mittleren Bereich der Substratsättigung nicht aus.

Aus den maximal erhaltenen Hill-Koefiizienten (CHANGEAUX, 1963; AT-

KINSON, 1966) von $n_H > 2$ kann man schließen, daß wenigstens drei Bindungsstellen für das Substrat KIV vorhanden sind. Die unterschiedlichen K_m-Werte könnte man nun auf verschiedene Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität zum Substrat zurückführen. Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist die Annahme von Konformationsumwandlungen mit einer Änderung der Affinität der Substrat-bindenden Zentren; mit dieser Annahme steht die gefundene Änderung der Kooperativität im Einklang (LEVITZKI und KOSHLAND, 1969).

Eine endgültige Klärung dieser Substratsättigungskurven mit quantitativen Aussagen ist erst nach Aufklärung der Enzymstruktur, d.h. vor allem der Anzahl an identischen oder nicht identischen Untereinheiten, und nach Bindungsstudien möglich. Da in allen Experimenten, in denen die Substrat(KIV)-Konzentration variiert wurde, für geringe oder hohe Konzentrationen eine Änderung des Verhaltens des Enzyms gefunden wurde, sind Substrat(KIV)-induzierte Konformationsänderungen bisher die beste Erklärungsmöglichkeit für das Substrat(KIV)-Sättigungsverhalten dieser IPM-Synthase.

4.7.2 Substrat(Ac~SCoA)-Sättigung

Die Substrat(Ac~SCoA)-Sättigungskurve wurde im Bereich von 0,01 - 4,25 mM Ac~SCoA bei verschiedenen Substrat(KIV)-Konzentrationen aufgenommen.

Ähnlich wie bei der Substratsättigung mit KIV ergab sich auch für die Substratsättigung mit Ac~SCoA angenähert ein hyperbolischer Kurvenverlauf (Abb. 26 A). Bei Vernachlässigung der Abweichungen wurde aus der Lineweaver-Burk-Auftragung ein gemittelter K_m-Wert von $7,5 \times 10^{-5}$ M bestimmt (Abb. 26 B). Die mittlere Affinität des Enzyms zu den beiden Substraten (K_m-Wert für KIV: 6×10^{-5} M) ist also annähernd gleich.

Aus den Abb. 26 A/C geht weiterhin hervor, daß die Substratsättigung an Ac~SCoA unabhängig von der KIV-Sättigung war. Die Substrat(KIV)-Hemmung

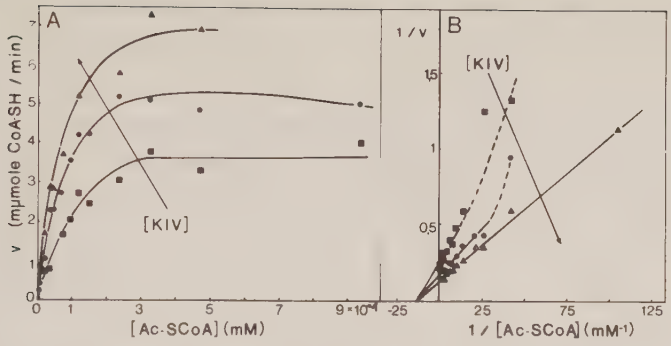
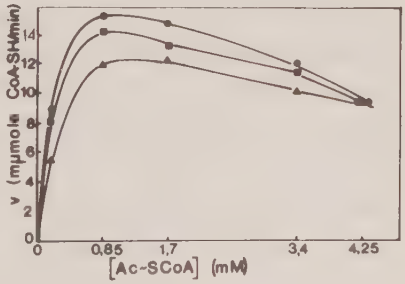


Abb. 26 Abhängigkeit der Aktivität der IPM-Synthase von der Substrat-(Ac~SCoA)-Konzentration bei drei verschiedenen Substrat(KIV)-Konzentrationen

A: Substrat(Ac~SCoA)-Sättigungskurven
Die Aktivität wurde im DTNB-Test mit 250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 8,0 und 250 mM KCl bei 30° C bestimmt. Ac~SCoA wurde wie angegeben variiert; die KIV-Konzentration betrug: 1,5 mM (—▲—), 0,125 mM (—●—), 0,025 mM (—■—).
B: Lineweaver-Burk-Auftragung zu Abb. 26 A

Abb. 26 C Substrat(Ac~SCoA)-Hemmung



Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im DTNB-Test mit 250 mM TRIS/HCl-Puffer mit 250 mM KCl und pH = 8,0. Die Substrat(KIV)-Konzentration betrug: (—▲—) 0,075 mM, (—●—) 0,75 mM (Sättigung), (—■—) 20 mM (Substrat(KIV)-Hemmung. Ac~SCoA wurde wie angegeben variiert.

(mittlere Kurve in Abb. 26 C) wurde durch höhere Ac~SCoA-Konzentrationen nicht aufgehoben.

Die Abweichungen von einer Michaelis-Menten-Kinetik wurden wiederum

besonders bei pH = 7,6 deutlich; in Abb. 27 ist die Substrat(Ac~SCoA)-Sättigung in TRIS/HCl-Puffer bei pH = 7,6 wiedergegeben. In der Lineweaver-Burk-Auftragung ergaben sich wie bei der Sättigung mit KIV zwei K_m-Werte: $1,4 \times 10^{-5}$ M für geringe Ac~SCoA-Konzentrationen bis 0,02 mM und 1×10^{-4} M für höhere Ac~SCoA-Konzentrationen.

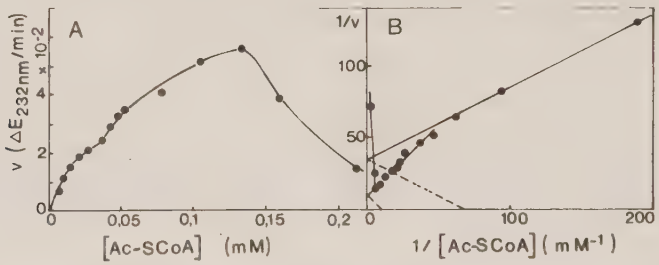


Abb. 27 Abhängigkeit der Aktivität der IPM-Synthase von der Substrat-(Ac~SCoA)-Konzentration bei pH = 7,6

A: Substrat(Ac~SCoA)-Sättigungskurve
Die Aktivität wurde im opt. Test bei 232 nm in 250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 7,6 bei 30° C bestimmt. KIV = 0,75 mM.
Ac~SCoA wurde wie angegeben variiert.
B: Lineweaver-Burk-Auftragung zu Abb. 27 A

Der Einfluß des pH-Wertes wurde auch bei sehr hohen Ac~SCoA-Konzentrationen deutlich. Während bei pH = 7,6 für Ac~SCoA-Konzentrationen über 0,15 mM eine deutliche Substrathemmung gefunden wurde, trat diese bei pH = 8,1 erst bei Konzentrationen über 1,5 mM auf.
Bei unphysiologisch hohen Ac~SCoA-Konzentrationen von über 2 mM katalysierte das Enzym bei pH = 8,0 eine Ac~SCoA-Spaltung in Abwesenheit von KIV, die durch hohe Konzentrationen (10 mM) an L-Leucin, dem Endprodukt-inhibitor des Enzyms, um 60 % verringert wurde.
Bei pH = 7,6 konnte keine solche Thioesterasenaktivität des Enzyms für Konzentrationen mit Substrathemmung (0,2 mM) nachgewiesen werden. Die Hemmbarkeit durch L-Leucin bestätigt, daß es sich um eine durch die IPM-Synthase katalysierte Reaktion handelt. FISCHER (1973) fand bei der

partiell angereicherten IPM-Synthase aus M. denitrificans ebenfalls eine durch L-Leucin hemmbare Spaltung von Ac~SCoA.

Durch Temperaturerhöhung trat wie bei der Substratsättigung für KIV auch bei der Substrat(Ac~SCoA)-Sättigung keine grundsätzliche Änderung des Kurvenverlaufes auf (graph. nicht dargestellt). Bei 40° C betrugen die K_m-Werte in TRIS/HCl-Puffer $1,5 \times 10^{-5}$ M für geringe und $1,2 \times 10^{-4}$ M für höhere Ac~SCoA-Konzentrationen.
Auch mit dem durch präparative Gelelektrophorese gereinigten Enzym ergab sich keine Sättigungskurve, die vollständig einer Michaelis-Menten-Kinetik entsprach; die K_m-Werte betrugen 6×10^{-5} M und $1,4 \times 10^{-4}$ M (Abb. 28).

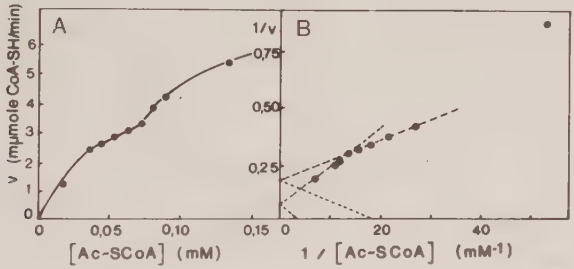


Abb. 28 Abhängigkeit der Aktivität der IPM-Synthase von der Substrat-(Ac~SCoA)-Konzentration bei Verwendung eines gelelektrophoretisch gereinigten Enzyms

A: Substrat(Ac~SCoA)-Sättigungskurve
Die Aktivität wurde im DTNB-Test in 250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 8,1, und bei 30° C bestimmt. KIV = 1,625 mM. Ac~SCoA wurde wie angegeben variiert.
B: Lineweaver-Burk-Auftragung zu Abb. 28 A

Ebenso hatte die Inkubation des Enzyms mit 10 mg/ml Rinderserumalbumin und die Proteinkonzentration von 0,35 mg/ml im Test keinen Einfluß auf den Kurvenverlauf (graph. nicht dargestellt). Die sonst im Testansatz eingesetzte geringe Proteinkonzentration kann also nicht für die Abweichungen verantwortlich gemacht werden.

Die Hill-Auftragung (Abb. 29) der Substrat(Ac~SCoA)-Sättigung ergab keine Gerade. Die Kurve gliederte sich in Abschnitte mit parabolischem Verlauf. Der Hill-Koeffizient erhöhte sich von $n_H = 0,73$ für geringe Ac~SCoA-Konzentrationen bis auf $n_H \sim 4$, so daß auf mindestens vier Bindungsstellen für Ac~SCoA geschlossen werden kann (vergl. dazu Diskussion). Die Änderungen können wie bei der KIV-Sättigung durch Substrat-induzierte Konformationsänderungen erklärt werden, bei denen ein Wechsel von negativer und positiver Kooperativität erfolgt (LEVITZKI und KOSHLAND, 1969; TEIPEL und KOSHLAND, 1969).

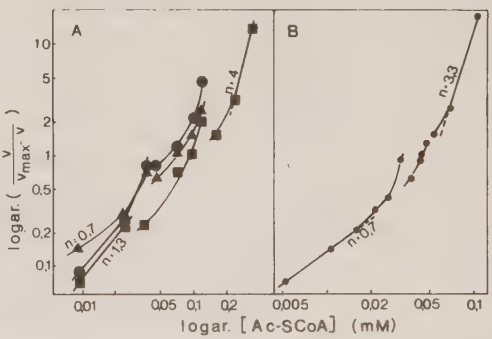


Abb. 29 Substrat(Ac~SCoA)-Sättigungskurve
A: Hill-Auftragung zu Abb. 26
B: Hill-Auftragung zu Abb. 27

4.8 Der Einfluß der Produkte IPM und CoA-SH auf die Enzymaktivität

Bei Enzymen mit mehr als einem Substrat kann die Substratbindung am Enzym sehr unterschiedlich erfolgen (CLELAND, 1963 I + II, 1967). Die ersten Hinweise auf den Substratbindungsmechanismus erhält man durch den Verlauf der Substratsättigungskurven in der Lineweaver-Burk-Auftragung. Eine Entscheidung über die Art des Mechanismus ist aber erst bei Kenntnis des Einflusses, den die gebildeten Produkte auf die Enzymaktivität haben, möglich (vergl. MAHLER und CORDES, 1966, S. 254 ff).

Bei reversiblen Enzymreaktionen begünstigen die Produkte die Rückreaktion,

bei nahezu irreversiblen Reaktionen verringern die Produkte durch Bildung des Enzym-Produkt-Komplexes eine Substratbindung und somit eine weitere Katalyse. Aus dem Substratbindungsmechanismus folgt, welches Produkt gegenüber welchem Substrat kompetitiv oder nicht kompetitiv hemmen kann (vergl. III.4.9).

Im Prinzip ist es möglich, daß durch eine stark ausgeprägte Produkthemmung eine direkte Regulierung der Enzymreaktion in der Zelle erfolgen kann. Eine solche schnelle Regulation könnte bei Reaktionen von Vorteil sein, an denen energiereiche Verbindungen - wie Ac~SCoA - beteiligt sind, die noch für andere, essentielle Reaktionen in der Zelle benötigt werden.

Durch die folgenden Untersuchungen sollte der Substratbindungsmechanismus und die Frage, ob evtl. eine Regulierung der IPM-Synthaseaktivität durch die Produkte erfolgt, geklärt werden.

4.8.1 α-Isopropylmalat (IPM)

Zur Bestimmung des Einflusses von IPM auf die Enzymaktivität wurde das Produkt, bei konstanten Substrat(KIV)- / (Ac~SCoA)-Konzentrationen, bis zu 10 mM im Aktivitätstest variiert. Die IPM-Synthase wird durch dieses Produkt in erster Näherung kompetitiv gehemmt, und zwar sowohl gegenüber dem Substrat KIV als auch gegenüber dem Substrat Ac~SCoA. Aus den Abb. 30/31 lassen sich folgende app. K_i-Werte entnehmen:

kompetitiv gegenüber Ac~SCoA:

$K_i = 9 \times 10^{-4}$ M bei 0,375 mM KIV

$K_i = 4 \times 10^{-3}$ M bei 0,75 mM KIV

kompetitiv gegenüber KIV:

$K_i = 7 \times 10^{-4}$ M bei 0,175 mM Ac~SCoA

$K_i = 5 \times 10^{-4}$ M bei 0,07 mM Ac~SCoA

$K_i = 6 \times 10^{-4}$ M bei 0.0375 mM Ac~SCoA
(graphisch nicht dargestellt)

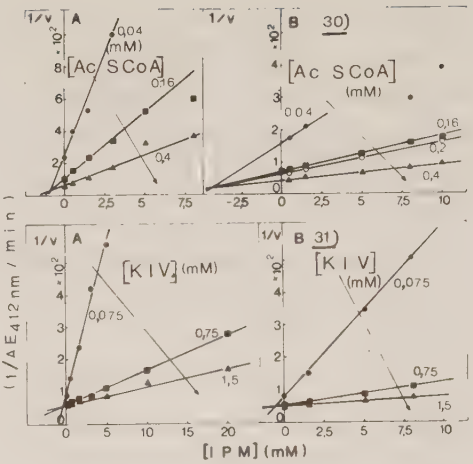


Abb. 30/31 Einfluß des Produktes IPM auf die Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Konzentration bei verschiedenen Substratkonzentrationen

A-B: Produkthemmung durch IPM in der Dixon-Auftragung. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im DTNB-Test (s. Methoden) in 250 mM TRIS/HCl-Puffer mit 100 mM KCl, pH = 8,0, bei 30° C

30 A: KIV = 0,375 mM
B: KIV = 0,75 mM

31 A: Ac~SCoA = 0,07 mM
B: Ac~SCoA = 0,175 mM

Um den Einfluß des Produktes IPM auf die Substrat(KIV)-/(Ac~SCoA)-Sättigung zu bestimmen, wurden die Substratkonzentrationen bei konstant gehaltener IPM-Konzentration variiert (Abb. 32 und 33). Der relative Verlauf der Substratsättigungskurven ändert sich durch die Anwesenheit des Inhibitors kaum (- bei Bestimmung der Anfangsaktivität im Test wurde die Produktkonzentration gleich null angenommen -).

Auffallend ist jedoch das verstärkte Abknicken der Kurven in der Lineweaver-Burk- und der Woolf-Auftragung (Abb. 32 B und C) bei niedrigen Substrat(Ac~SCoA)-Konzentrationen durch die Anwesenheit des Produktes. Aus den graphischen Darstellungen läßt sich nicht eindeutig ablesen, ob sich, wie angenommen wird, an dieser Stelle auf Grund homotroper oder/und heterotroper Wechselwirkungen nur der K_i-Wert ändert oder ob ein anderer Hemmechanismus vorliegt. Für höhere Substratkonzentrationen, sowohl für KIV als auch für Ac~SCoA, resultiert aus beiden Auftragungen ein kompetitiver Hemmechanismus. Damit wurden die Ergebnisse aus der Dixon-Auftragung bestätigt: auch dort sind schon schwache kooperative Wechselwirkungen vom IPM zu sehen.

Da die Kurve für 2,5 mM IPM im Lineweaver-Burk-Diagramm (Abb. 33 C)

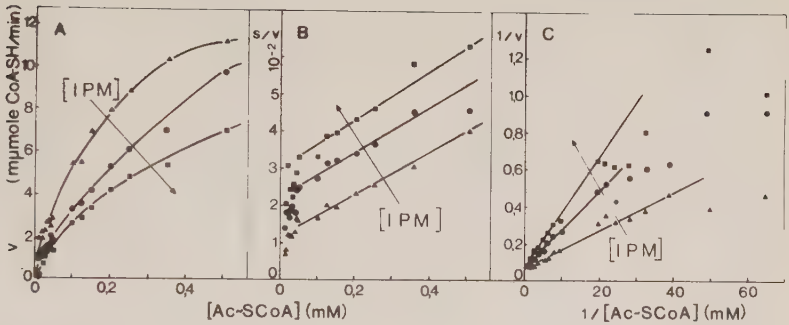


Abb. 32 Einfluß des Produktes IPM auf die Enzymaktivität in Abhängigkeit der Substrat(Ac~SCoA)-Konzentration

A: Produkthemmung durch IPM
Die Enzymaktivität wurde im DTNB-Test (s. Methoden) bestimmt; 250 mM TRIS/HCl-Puffer mit 250 mM KCl, pH = 8,0; 30° C, KIV = 0,75 mM, Ac~SCoA wie angegeben variiert; IPM = 1,5 mM (—▲—); 5 mM (—●—); 8 mM (—■—).
B: Woolf(s/v gegen s)-Auftragung zu Abb. 32 A
C: Lineweaver-Burk-Auftragung zu Abb. 32 A

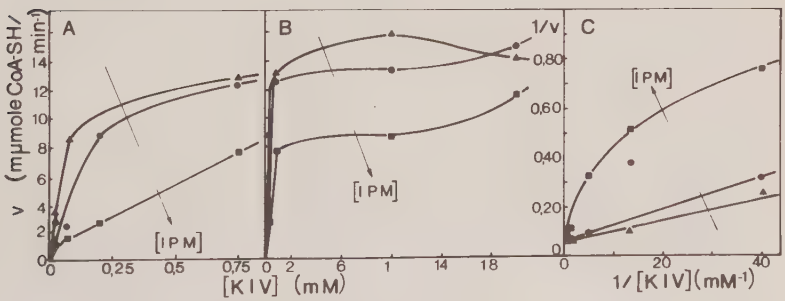


Abb. 33 Einfluß des Produktes IPM auf die Enzymaktivität in Abhängigkeit der Substrat(KIV)-Konzentration

A-C: Produkthemmung durch IPM
Die Enzymaktivität wurde im DTNB-Test (s. Methoden) bestimmt; 250 mM TRIS/HCl-Puffer mit 250 mM KCl, pH = 8,0, 40° C; Ac~SCoA = 0,105 mM; KIV wie angegeben variiert; IPM = 0 mM (—▲—), 1 mM (—●—), 2,5 mM (—■—).
A KIV variiert von 0 - 0,75 mM; B KIV variiert von 0 - 20 mM;
C Lineweaver-Burk-Auftragung zu Abb. 33 A/B

hyperbolisch verläuft, kann IPM mit verschiedenen Enzymformen (MAHLER und CORDES, 1967, S. 255), d.h. sowohl mit dem freien Enzym als auch mit den Enzym-Substratkomplexen reagieren.

Aus den hohen app. K_i-Werten kann man schließen, daß der Produkthemmung durch IPM in der Zelle unter normalen Bedingungen keine regulatorische Funktion zukommt. Eine scheinbare Hemmung des Enzyms durch eine Rückreaktion ist durch den Verbrauch der energiereichen Verbindung Ac~SCoA nahezu auszuschließen (WEBSTER und GROSS, 1965).

4.8.2 Coenzym A (CoA-SH)

Zur Prüfung des Einflusses des Produktes CoA-SH wurde es im Konzentrationsbereich von 0 - 300 μM dem Testansatz zugesetzt. Höhere Konzentrationen konnten auf Grund der Eigenabsorption, obwohl Küvetten mit nur 0,5 cm Lichtweg verwendet wurden, nicht eingesetzt werden.
Die Hemmung durch CoA-SH (Abb. 34) scheint komplizierter zu sein als die durch IPM. In der Auftragung nach Dixon (Abb. 34 B) wurden stark parabolische Kurven erhalten.
Bei Betrachtung der ersten zwei bis drei Punkte, d.h. der Werte für geringe CoA-SH-Konzentrationen, bei denen die kooperativen Wechselwirkungen noch keinen Einfluß haben, ergab sich gegenüber KIV ein kompetitiver Hemmmechanismus mit einem app. K_i-Wert um 2×10^{-4} M ($K_{0,5}$-Wert für die CoA-SH-Hemmung: $2,5 \times 10^{-4}$ M). Durch pH-Änderung von pH = 7,5 (Abb. 34) auf pH = 8,0 (Abb. 35, Auftragung nach Dixon) änderte sich die Art des Kurvenverlaufes nicht.
Der Verlauf der Kurve für 0,03 mM KIV (< gem. K_m-Wert) in Abb. 35 zeigt, daß die Hemmung bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen anders ist als bei Konzentrationen, die höher als der K_m-Wert sind; die Verlängerung der Kurve über die y-Achse hinaus schneidet sich nicht mit den Ver-

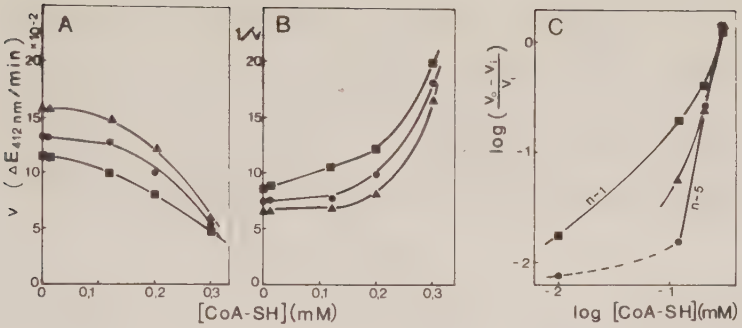
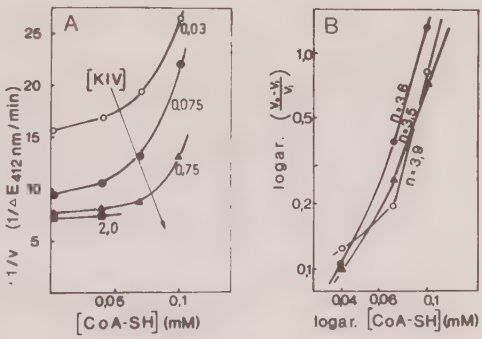


Abb. 34 Einfluß des Produktes CoA-SH auf die Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Konzentration bei pH = 7,5

A: Produkt(CoA-SH)-Hemmung bei drei verschiedenen Substrat-(KIV)-Konzentrationen
Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im optischen Test bei 232 nm (s. Methoden) in 250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 7,5 und 30° C. Die optische Schichtdicke betrug 0,5 cm bei einem normalen Testvolumen von 1 ml. Ac~SCoA = 0,075 mM; KIV = 0,075 mM (—■—), 0,09 mM (—●—), 0,75 mM (—▲—).
B: Dixon-Auftragung zu Abb. 34 A
C: Hill-Auftragung zu Abb. 34 A

Abb. 35 Einfluß des Produktes CoA-SH auf die Enzymaktivität bei pH = 8,0

A: Produkt(CoA-SH)-Hemmung in der Dixon-Auftragung
Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im DTNB-Test (s. Methoden) in 250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 8,0, 30° C; Ac~SCoA = 0,1 mM; KIV = 0,03 mM (—○—), 0,075 mM (—●—) 0,75 mM (—▲—), 2 mM (—■—).
B: Hill-Auftragung zu Abb. 35 A



längerungen der anderen Kurven in einem Punkt (app. K_i-Wert = $1,0 \times 10^{-4}$ M), sondern läuft parallel zur Kurve mit KIV = 0,075 mM (> gem. K_m-Wert), was

dann einem unkompetitiven Hemmtypus entspräche. Da Konformationsänderungen für den Konzentrationsbereich um den K_m-Wert angenommen werden, darf diese Kurve nicht mit verwendet werden, sondern sie müßte mit weiteren Kurven bei geringer Substratkonzentration verglichen werden. Anzumerken ist noch, daß durch hohe Substrat(KIV)-Konzentrationen die gemeinsame Hemmung durch CoA-SH (120 µM) und IPM (2,5 mM) aufgehoben wird (Abb. 36).

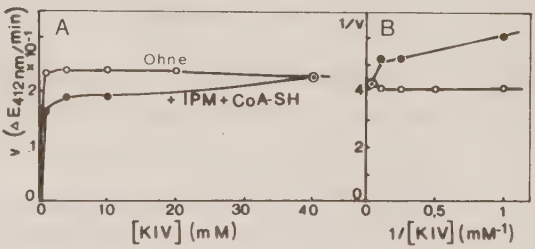


Abb. 36 Der gemeinsame Einfluß der Produkte IPM und CoA-SH auf die Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Substrat-(KIV)-Konzentration

A: Substrat(KIV)-Sättigung in Gegenwart der Produkte IPM (2,5 mM) und CoA-SH (120 µM)—●— Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im DTNB-Test (s. Methoden) in 250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 8,0 und bei 30° C. Ac~SCoA = 0,17 mM, KIV wie angegeben variiert.
B: Lineweaver-Burk-Auftragung zu Abb. 36 A

Um die Hemmung durch CoA-SH genauer zu charakterisieren, wurden die erhaltenen Werte aus den Abb. 34 und 35 nach der für die Hemmung durch Inhibitoren modifizierten Hill-Gleichung: $\log (v_o - v_i / v_i = n' \log I - \log K$ (mit v_o = Reaktionsgeschwindigkeit in Abwesenheit und V_i = Reaktionsgeschwindigkeit in Anwesenheit des Effektors I) aufgetragen, die auch auf eine Produkthemmung nahezu irreversibler Reaktionen anwendbar ist. Aus der Auftragung (Abb. 34 C und 35 B) ergaben sich Koeffizienten bis zu $n'_H = 5$. Dieser Wert liegt höher als die erhaltenen Werte für Ac~SCoA ($n_H < 4$).
Dies kann verschieden gedeutet werden:

1. Das Produkt CoA-SH zeigt nur stärkere Wechselwirkungen als das Substrat Ac~SCoA, so daß auch für das Substrat mehr als vier Bindungs-

stellen vorhanden sind.

2. Die höheren CoA-SH-Konzentrationen wirken als SH-Reagenz (s. III. 4. 6. 1).

Das Vorhandensein einer zusätzlichen allosterischen Bindungsstelle für CoA-SH ist wegen des hohen K_i-Wertes unwahrscheinlich.
Obwohl das Produkt CoA-SH stärkere Wechselwirkungen als das Produkt IPM zeigte, kann man, da der app. K_i-Wert (2×10^{-4} M) ebenfalls sehr hoch ist, auch für CoA-SH eine entscheidende regulatorische Funktion ausschließen. Nur unter extremen Bedingungen, z.B. bei Energiemangel, wenn nicht schnell genug CoA-SH zu Ac~SCoA regeneriert werden kann, würde ein zu starker Verbrauch des noch vorhandenen Ac~SCoA für die Leucinbiosynthese verhindert werden können (vgl. Inaktivierung durch CoA-SH im folgenden Kapitel).

4. 8. 3 Inaktivierung des Enzyms durch CoA-SH

Während der Anreicherung war der Verdacht entstanden, daß Ac~SCoA / CoA-SH die IPM-Synthase inaktivierte. Ac~SCoA wird bei pH-Werten über dem Neutralpunkt stets in geringer Menge zu freiem CoA-SH hydrolysiert. Es wurde daher die Wirkung von 1 µM und 10 µM CoA-SH bei Zimmertemperatur auf die IPM-Synthase bei pH = 7,5 und 8,2 in Ab- und Anwesenheit von 2 mM KIV, 1 mM L-Valin oder 1 mM L-Leucin geprüft (Abb. 37). Durch die Zugabe des Substrates KIV und der Effektoren sollte geklärt werden, wieweit eine evtl. Inaktivierung unter physiologischen Verhältnissen eine Rolle spielt.
Die Inaktivierungskurven zeigen, daß auf eine erste rasche Phase der Inaktivierung (nach 1 Minute gemessen) eine langsamere folgte. Die Stärke der Inaktivierung war vom pH-Wert und von der CoA-SH-Konzentration sowie von der An- bzw. Abwesenheit der Effektoren abhängig. Bei pH = 8,2 war die Inaktivierung durch 10 µM CoA-SH sehr viel schneller als bei pH = 7,5. So sank die Aktivität in 50 Minuten bei pH = 8,2 auf 20 %, bei pH = 7,5 in

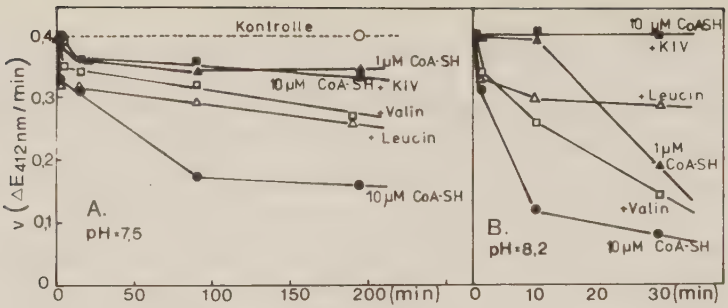


Abb. 37 Einfluß des Produktes CoA-SH auf die Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit, in An- und Abwesenheit vom Substrat-KIV und von den Effektoren L-Leucin und L-Valin

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im DTNB-Test (s. Methoden) in 250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 8,2 bei 30° C. Ac~SCoA = 0,94 mM, KIV = 1,5 mM.
Die hohe Substratkonzentration diente zur Aufhebung einer evtl. CoA-SH-Hemmung im Test; die CoA-SH-Konzentration betrug hier 1/40 der Inkubationskonzentration.
A: Inkubation in $(K,H)_3PO_4$-Puffer, 50 mM mit 100 mM KCl, pH = 7,5; die Inkubationstemperatur betrug 23° C. KIV = 2 mM, L-Leucin = 1 mM, L-Valin = 1 mM.
B: Inkubation wie unter A, aber pH = 8,2.

200 Minuten nur auf 40 %. Andererseits wurde bei pH = 8,2 die Inaktivierung durch 10 µM CoA-SH durch die Anwesenheit von 2 mM KIV vollständig verhindert, während bei pH = 7,5 durch KIV-Zugabe die Inaktivierung nur stark verringert wurde (von 60 % auf 17,5 % Inaktivierung).

Die Aminosäuren L-Valin (1 mM) und L-Leucin (1 mM) verzögerten bei pH = 7,5 die Inaktivierung um ca. 40 %, bei pH = 8,2 verringerte L-Leucin die Aktivitätsabnahme um 62,5 %, L-Valin dagegen nur um 19 %. Dieses Verhalten ist ein Hinweis auf eine unterschiedliche Bindung von L-Valin und L-Leucin.

Die Inaktivierung durch CoA-SH scheint irreversibel zu sein, denn durch Inkubation mit KIV erfolgte keine Reaktivierung.

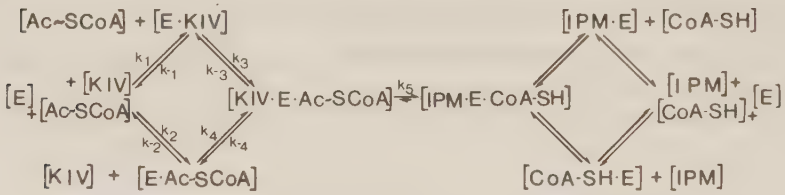
Im Gegensatz zu CoA-SH zeigte das Produkt IPM (10 mM) bei pH = 7,2 und pH = 8,2 bei einer Inkubation bis zu 8 h keinen Einfluß auf die Enzymstabilität.

Auf Grund der Wirksamkeit von 1 - 10 µM CoA-SH bei pH = 7,5 (mittlerer intracellulärer pH-Wert ~ 7,0 (AHRENS, 1970)) in Anwesenheit vom Substrat KIV könnte dieser Inaktivierung eine gewisse physiologische Bedeutung zugemessen werden; diese Reaktion könnte den Organismus gegen einen zu starken Verbrauch an Ac~SCoA für die Leucinbiosynthese durch dieses Enzym schützen. Die Wirkung von CoA-SH in Abwesenheit von KIV könnte einer Verhinderung einer unspezifischen Spaltung von Ac~SCoA durch die IPM-Synthase dienen.
Die anfängliche schnelle Inaktivierung durch CoA-SH in Abwesenheit von KIV erklärt auch, warum im Testansatz (pH = 8,0), der mit dem Substrat KIV gestartet wurde, eine geringere Aktivität gefunden wurde als im Testansatz, der mit dem Enzym gestartet wurde.

4.9 Substratsättigungsmechanismus

Für eine Beurteilung des Substratbindungsmechanismus auf Grund des Einflusses der Produkte auf die Enzymaktivität muß man bei Mehr-Substrat-Mehr-Produkt-Reaktionen die Produkte den Substraten zuordnen. Formal kann man IPM als Produkt des Substrates KIV und CoA-SH als Produkt des Substrates Ac~SCoA betrachten.
Eine kompetitive Hemmung der Bindung von KIV sowohl durch IPM als auch durch CoA-SH bzw. eine kompetitive Hemmung durch IPM sowohl gegenüber Ac~SCoA als auch gegenüber KIV schließt für die Substratbindung der IPM-Synthase den "Sequentiellen-Ordered-Mechanismus", den "Ping-Pong-" und den "Theorell-Chance-Mechanismus" aus. Bei dem Sequentiellen-Ordered-Mechanismus dürfte allein IPM gegenüber KIV kompetitiv wirken, wenn KIV das zuerst gebundene Substrat ist. Wenn Ac~SCoA das zuerst gebundene Substrat ist, dürfte nur CoA-SH gegenüber Ac~SCoA kompetitiv wirken. Bei den beiden anderen Mechanismen müßte für das Substrat Ac~SCoA nur das Produkt IPM, nicht aber CoA-SH, sowie für das Substrat

KIV nur das Produkt CoA-SH und nicht IPM ein kompetitiver Inhibitor sein (MAHLER und CORDES, 1966, S. 237 ff). Dagegen sollten bei einem "Rapid-Equilibrium-Random-Mechanismus" alle Produkte kompetitiv die Substratbindungen hemmen (CLELAND, 1963 II).
Die gefundene Art der Produkthemmung bei der IPM-Synthase aus H 16 - A 81 läßt für dieses Enzym auf den "Rapid Equilibrium Random BiBi Mechanismus" schließen (Schema 3). Damit stehen die Befunde der Substratsättigungskurven (Lineweaver-Burk-Auftragung, Abb. 21 B, 22 C, 26 B) im Einklang.



Schema 3 Random-Mechanismus für die IPM-Synthasereaktion

Liegt der Schnittpunkt der über die y-Achse hinaus verlängerten Substratsättigungskurven exakt auf der x-Achse, so ergibt sich ein Random-Mechanismus, bei dem die Gleichgewichtskonstante k_1 mit k_3 sowie k_2 mit k_4 (s. Schema 3) identisch ist. Liegt der Schnittpunkt etwas oberhalb der x-Achse, so sind die Konstanten verschieden groß, d. h. die Bindung eines Substrates (x) an das freie Enzym unterscheidet sich von der Bindung des Substrates (x) an den Substrat(y)-Enzymkomplex. Auf Grund der aufgetretenen homotropen Kooperativitäten war nicht eindeutig festzulegen, ob für alle Bereiche die Bindung von KIV durch die Bindung von Ac~SCoA (und umgekehrt) vollkommen ohne Einfluß bleibt.

4. 10 Die Unspezifität der IPM-Synthase bezüglich ihrer Substrate α-Ketoisovaleriansäure und Acetyl~S-Coenzym A

4. 10. 1 Analoge und homologe Verbindungen des Substrates α-Ketoisovaleriansäure (KIV)

Bei der IPM-Synthase aus N. crassa (WEBSTER et al., 1965), Pseudomonas aeruginosa (RABIN et al., 1968), S. typhimurium (KOHLHAW et al., 1969), S. carlsbergensis (SAI et al., 1969), Arthrobacter St. 23 (BAUMGARTEN, 1969), H. eutropha H 16 (HILL, 1968), Saccharomyces spec. (ULM et al., 1972) zeigten die Autoren, daß das Enzym verschiedene α-Ketosäuren als Substrat verwenden kann. KIV mit dem kleinsten (app.) K_m-Wert wird als das "natürliche" Substrat angesehen, obwohl α-Ketobutyrat bei allen oben genannten Enzymen ein mehr als doppelt so großes v_{max} ergibt.

Auch das gereinigte Enzym aus H 16 - A 81 zeigt die Unspezifität. Die in den Tab. 12 und 13 aufgeführten α-Ketosäuren wurden auf Substrateigenschaft für die IPM-Synthase geprüft. Umgesetzt wurden außer KIV aber nur Pyruvat (α-Ketopropionat), α-Ketobutyrat und α-Keto-n-valerat. Die von HILL (1968) durch Markierung mit radioaktivem Acetat in Rohextrakten gefundene Umsetzung von Glyoxylat und α-Ketoisocaproat konnte nicht bestätigt werden. Auch die höheren Homologen wie α-Ketooctan- und α-Ketononansäure reagierten nicht als Substrate.

4. 10. 1. 1 Substratsättigung der umgesetzten α-Ketosäuren

Die Abb. 38 zeigt die Substratsättigungskurven für die umgesetzten α-Ketosäuren. Die Sättigungskurven entsprechen annähernd der von KIV (s. III. 4. 7. 1). Sie bestätigen noch einmal den ungewöhnlichen Substratsättigungsverlauf des Enzyms: es traten nur "bumpy curves" auf.

Die $K_{0.5}$-Werte sind in Tab. 12 zusammengefaßt. Außerdem wurden die app.

v_{max}-Werte der Homologen aus den Sättigungskurven abgelesen und in Tab. 12 auf den app. v_{max}-Wert von KIV bezogen. Während die $K_{0.5}$-Werte mit zunehmender Kettenlänge stetig kleiner werden, d.h. die Affinität des Enzyms für die längeren α-Ketosäuren zunimmt, zeigen die app. v_{max}-Werte nicht diese Regelmäßigkeit. α-Ketobutyrat wird viermal so schnell umgesetzt wie KIV. Für Pyruvat und den Methylester von KIV erhält man bei entsprechend hohen Substratkonzentrationen nahezu denselben v_{max}-Wert wie für KIV, für α-Ketovalerat nur den 0,6fachen Wert.
Durch Zugabe von L-Leucin läßt sich bei den geprüften Substraten die Umsetzung annähernd gleich stark hemmen. Diese Befunde stehen mit der Vorstellung im Einklang, daß keine substratspezifischen Wechselwirkungen zwischen der Substratbindung der verschiedenen α-Ketosäuren und der Hemmung durch L-Leucin bestehen.

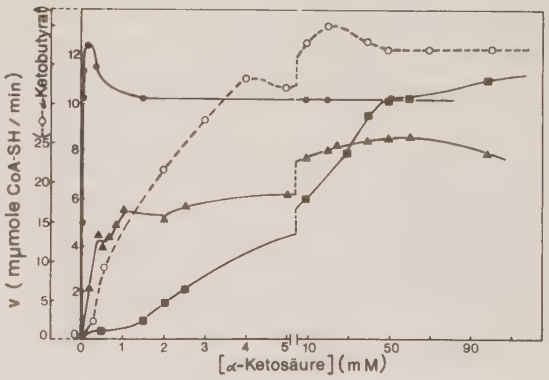


Abb. 38 Substratsättigungskurven der α-Ketosäuren

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte bei 30° C im DTNB-Test (s. Methoden) mit 250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 8,1; Ac~SCoA = 0,46 mM, die α-Ketosäuren wurden wie in der Abb. angegeben variiert. KIV (–●–), α-Keto-n-Valerat (–▲–), Pyruvat (–■–), α-Ketobutyrat (getrennte Ordinate (---o---).

Eine anfänglich gemessene Umsetzung von Oxalacetat beruhte auf dem Zerfall dieser Verbindung unter den Testbedingungen (pH = 8,0) in CO_2 und Pyruvat; letzteres wird dann durch die IPM-Synthase umgesetzt. Wurde durch Lactatdehydrogenase- und NADH -Zusatz*das Pyruvat ständig abge-

* NADH hemmt auch bei hoher Konzentration (50 mM) die IPM-Synthase-Aktivität nicht.

Tab. 12 Umsetzung von substratanalogen α-Ketocarbonsäuren

Ketosäure	$K_{0,5}$ (M)	app. v_{max} / app. v_{max} für α-KIV	Hemmung durch L-Leucin Restaktivität in %	
			*pH = 8,0 (2 mM)	**pH = 7,5 (0,5 mM)
2-Ketopropionat (Pyruvat)	$1,0 \times 10^{-2}$	~ 1	37	12
2-Ketobutyrat	$1,8 \times 10^{-3}$	~ 4	40	15
2-Ketovalerat	5×10^{-4}	0,6	34	8
2-Ketoisovalerat	6×10^{-5}	1	32	10
4-Ketovalerat	-	<0,05	nicht meßbar	
2-Keto-3-Methylvalerat ("α-Keto-Isoleucin")	-	<0,02	-	-
2-Keto-4-Methylvalerat (α-Ketoisocaproat)	-	<0,02	-	-
Oxalacetat	s. Text			
2-Ketoisovalerian-methylester	5×10^{-3}	0,9	-	-

* Optischer Test mit DTNB bei 412 nm; der optische Test bei 232 nm ist hier durch die hohe Absorption der α-Ketosäuren bei den eingesetzten Konzentrationen (2,5facher $K_{0,5}$ -Wert) nicht anwendbar; Ac~SCoA = 0,475 mM; Test sonst wie unter Methoden angegeben.

** Fluorimetrischer Test, Bedingungen wie unter Methoden angegeben; α-Ketosäuren = 20 mM, ausgenommen Pyruvat = 100 mM.

fangen, so ergab sich, daß Oxalacetat bis zu einer Konzentration von 400 mM in erfaßbaren Mengen nicht umgesetzt wurde.

4. 10. 1. 2 Hemmung durch nicht umgesetzte Homologe

Es entstand die Frage, ob die nicht umgesetzten Substratanalogen zwar nicht umgesetzt aber gebunden werden, oder ob sie mit dem katalytischen Zentrum überhaupt nicht mehr reagieren. Gebundene, aber nicht umgesetzte Substratanaloge sind kompetitive Hemmstoffe, während nicht gebundene Verbindungen keinen Einfluß zeigen.
Aus diesem Grunde wurde die Wirkung der verschiedenen α-Ketosäuren bei zwei verschiedenen Konzentrationen (2 und 10 mM) auf die α-IPM-Synthasereaktion mit KIV und Ac~SCoA geprüft (Tab. 13). Während Glyoxylat und α-Ketoglutarat keinen Effekt zeigten und daher wohl auch nicht gebunden werden, hemmen die anderen α-Ketosäuren, zwar unterschiedlich stark, die Reaktion, so daß man annehmen kann, daß sie gebunden werden. Auffallend ist die 100 %ige Hemmung durch 2-Ketoisocaproat (2-Keto-4-Methylvalerat) und die starke Hemmung durch 2-Keto-3-Methylvalerat. Diese Verbindungen sind gleichzeitig α-Ketohomologe der Aminosäure L-Leucin bzw. L-Isoleucin und können daher sowohl als Substrat- als auch als Endproduktanaloge wirken.
Die geringere Hemmung durch höhere gegenüber niedrigeren Konzentrationen an 4-Ketovalerat und 5-Ketocaproat deuten auf eine minimale Umsetzung oder auf einen geringen Einfluß auf die Bindung des Substrates KIV hin, welches nicht in der Sättigung vorlag.
Für Pyruvat und α-Ketobuttersäure erhält man Werte über 100 %, da diese Säuren umgesetzt werden und in höherer Sättigungskonzentration vorlagen als KIV.

4. 10. 1. 3 Bindungsstelle am Substratmolekül

Da Glyoxylat anscheinend nicht, Pyruvat sehr schlecht ($K_{0,5} = 10^{-2}$ M), 2-Ketobutyrat ($K_{0,5}=10^{-3}$) und die nächst höheren Homologen ($K_{0,5}=5\times10^{-4}$ M und $K_{0,5}=$

Tab. 13 Hemmung der IPM-Synthasereaktion mit KIV und Ac~SCoA durch Zusatz von α-Ketosäuren und Carbonsäuren

Anz. der C-Atome	α-Ketosäuren	% Restaktivität			Carbonsäuren (K-Salze)*	% Restaktivität	
		0,5 mM	2 mM	10 mM		10 mM	50 mM
1	-	-	-	-	Formiat	100	100
2	Glyoxylat		100	100	Acetat	100	100
3	Pyruvat		108	-	Propionat	100	98
4	2-Ketobutyrat		204	-	Butyrat	98	74
5	2-Ketoglutarat		100	100	-	-	-
5	4-Ketovalerat		90	94	n-Valerat	82	78
6	2-Ketocaproat		77	-	n-Caproat	82	53
6	5-Ketocaproat		82	100	-	-	-
6	2-Ketoisocaproat	<0,1	<0,1	-	iso-Caproat	45	<0,1
6	2-Keto-3-Methyl-valerat	29	2	<0,1	-	-	-
6	2-Ketogluconat		94	98	-	-	-
6	2-Ketoadipinat		94	74	-	-	-
8	2-Ketooctanat		75	43	n-Octanat	-	63
9	2-Ketononanat		83	71	n-Nonanat	-	65

Verwendet wurde der DTNB-Test, ΔE_{412nm}; KIV: 0,09 mM, Ac~SCoA: 0,47 mM, pH = 8,0;
ohne Zusatz = 100 % Aktivität, Zusätze wie angegeben.

* Hierbei wurde die Hemmung durch K^+ schon berücksichtigt.

6×10^{-5} M) gut gebunden werden, bestand die Vermutung, daß für die Bindung am katalytischen Zentrum die CH_2- bzw. CH_3-Gruppierung verantwortlich ist. Für diesen Fall sollten dann auch einfache Carbonsäuren wie z.B. n-Valeriansäure oder n-Octansäure gebunden werden, d.h. als Inhibitor fungieren. Dies ließ sich für die höheren Carbonsäuren (Butyrat etc.)

bestätigen (s. Tabelle 13). Am Beispiel der α-Ketooctansäure und der n-Octansäure sollte im einzelnen gezeigt werden, daß die gefundene Hemmung auf der Substratanalogie beruht (kompetitive Hemmung). Die Abb. 39 gibt das Hemmverhalten dieser Säuren in der Lineweaver-Burk-Auftragung wieder. n-Octansäure zeigt das Verhalten eines kompetitiven Inhibitors, d.h. die Geraden schneiden sich auf der y-Achse. Der Verlauf der in Gegenwart von α-Ketooctanat aufgenommenen Substrat(KIV)-Sättigungskurve spiegelt den unregelmäßigen Verlauf der in Abwesenheit des Inhibitors gemessenen Kurve wider.

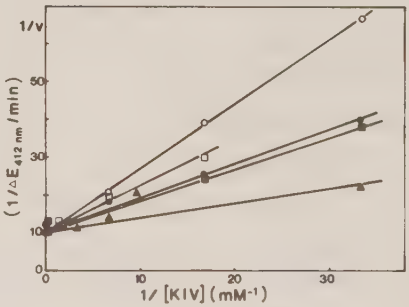


Abb. 39 Hemmung durch α-Ketooctan- und n-Octansäure in Abhängigkeit der KIV-Konzentration

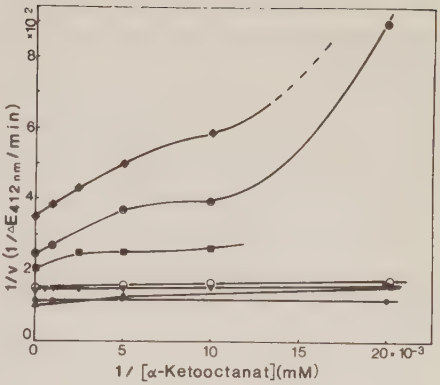
Die Aktivität wurde im opt. Test mit DTNB und 250 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer pH = 8,1 bei 30° C bestimmt. Ac-SCoA: 0,24 mM, KIV wurde wie angegeben variiert. Ohne Zusatz (—▲—), Octansäure 20 mM (—□—) und 2 mM (—■—); α-Ketooctansäure 10 mM (—○—) und 1 mM (—●—).

Berücksichtigt man den Effekt der Substrathemmung, so läßt sich auch für die α-Ketooctansäure die Hemmung durch einen kompetitiven Mechanismus beschreiben. Die Auftragung nach Dixon (Abb. 40) ergibt hier keine eindeutige Aussage. Eindeutig läßt sich aus diesem Experiment schließen, daß die Sättigung mit beiden Substraten eine Hemmung durch 2-Ketooctansäure (bis zu 20 mM) aufhebt.

Aus der, durch Substratzugabe aufhebbaren, Hemmung der IPM-Synthase-Aktivität durch höhere Carbonsäuren und der, schon in niedriger Konzentration auftretenden Inhibition durch die nicht umgesetzten α-Ketosäuren läßt sich schließen, daß die Bindung sowohl über den hydrophoben Säurerest als auch über die α-Ketofunktion erfolgt. Da der $K_{0,5}$-Wert für den

Abb. 40 Hemmung durch α-Ketooctansäure bei verschiedenen Substratkonzentrationen

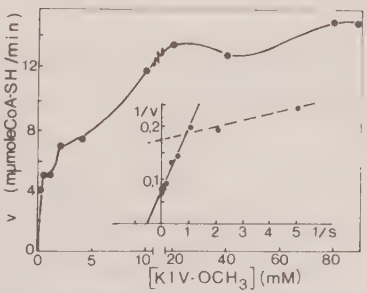
Die Bestimmung der Aktivität erfolgte im opt. Test mit DTNB, 250 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 8,1 und bei 30° C. Die Substratkonzentration wurde wie folgt variiert: —◆—0,0225 mM KIV, 0,23 mM Ac~SCoA;—●—0,045 mM KIV, 0,23 mM Ac~SCoA;—■—0,15 mM KIV, 0,23 mM Ac~SCoA;—▼—0,375 mM KIV, 0,23 mM Ac SCoA;—▲—0,375 mM KIV, 0,69 mM Ac~SCoA;—○—2,25 mM KIV, 0,23 mM Ac~SCoA;—●—2,25 mM KIV, 0,69 mM Ac~SCoA.



α-Ketoisovalerianester (Abb. 41/ 5×10^{-3} M) um rund zwei Zehnerpotenzen über dem von KIV (6×10^{-5} M) liegt, wird vermutet, daß auch die freie Carboxyl-Funktion für eine optimale Bindung nötig ist. Bei der Malat-Synthase wird nach EGGERER und KLETTE (1967) die freie Carboxylgruppe zur Basenkatalyse der Enolisierung von Ac~SCoA benötigt, so daß die geringe Umsetzung auf die Herabsetzung der Katalyse zurückzuführen ist. Beim Fehlen der Carboxylgruppe sollte die Enolisierung über die Säurekatalyse am Enzymprotein bzw. am darin enthaltenen Metallion erfolgen (vgl. EDTA-Wirkung auf die IPM-Synthase, III. 4. 14).

Abb. 41 Substratsättigung mit KIV-Methylester

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im DTNB-Test (s. Methoden) mit 250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 8,0 bei 30° C. Ac~SCoA = 0,46 mM, α-KIV-Methylester wurde wie angegeben variiert.



4. 10. 2 Acetyl~SCoenzym A - Homologe und Analoge

Während die Unspezifität der IPM-Synthase aus anderen Organismen bezüglich der α-Ketosäuren von den genannten Autoren (s. III. 4. 10. 1) schon teilweise beschrieben worden ist, liegen für das zweite Substrat Acetyl~SCoA bisher keine ausführlichen Untersuchungen vor. Nur KOHLHAW et al. (1969) berichten, daß das Enzym aus S. typhimurium N,S-Diacetyl-Cysteamin nicht als Substrat verwenden kann und auch die Reaktion mit Ac~SCoA (app. K_m-Wert = 2×10^{-4}) durch das Coenzym-A-Analoge (1 mM) weder gehemmt noch aktiviert wird.

4. 10. 2. 1 Bindungsstelle am Substratmolekül

N,S-Diacetyl-Cysteamin ist kein gutes Strukturanaloges für Ac~SCoA, falls die Substratbindung am Enzym hauptsächlich über die Adenosinkomponente des Coenzyms A erfolgen sollte. Um das zu untersuchen, wurden als erstes freie CoA-SH-Analoge und Derivate eingesetzt und auf ihre Fähigkeit, die Enzymreaktion zu beeinflussen, geprüft. Da CoA-SH eine ausgeprägte Produkthemmung (in erster Näherung kompetitiv) zeigt, sollten analoge CoA-SH-Verbindungen, die vom Enzym vergleichsweise gut gebunden werden, ebenfalls die α-IPM-Synthaseaktivität hemmen.
Wie aus Tab. 14 hervorgeht, hemmen 3'-Dephospho-CoA-SH weniger und Pantethein die Enzymaktivität vergleichsweise noch weniger als freies CoA-SH.
N-Acetyl-S-Acetacetyl-Cysteamin hatte keine Wirkung auf die Enzymaktivität. Hingegen zeigte Palmityl~SCoA eine stärkere Hemmung als freies CoA-SH. Daraufhin wurden 3'-Dephospho-CoA-SH und Pantethein (nach SIMON und SHEMIN (1953) acetyliert und eingesetzt.
3'-De-Phospho-Acetyl SCoA wird vom Enzym in Gegenwart von KIV umgesetzt. In Abb. 42 ist die Umsetzung in Abhängigkeit von der Konzentration dargestellt. Der $K_{0,5}$-Wert beträgt $1,25 \times 10^{-4}$ M ($K_{0,5}$-Wert für Ac~SCoA:

$7,5 \times 10^{-5}$ M). S~Acetyl-pantethein wird, selbst bei einer Konzentration von 1,5 mM, nicht umgesetzt, sondern hemmt die IPM-Synthase etwas mehr als das nicht acetylierte Pantethein.

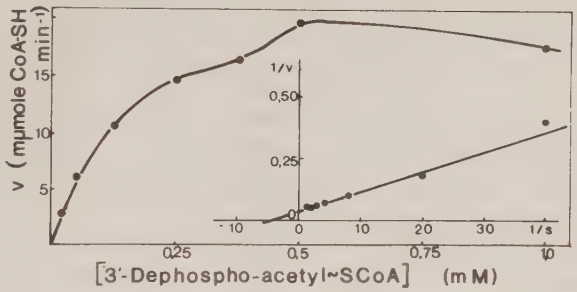


Abb. 42 Substratsättigung für 3'-De-Phospho-Acetyl~SCoA

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im DTNB-Test; pH = 8,0; bei 30° C; α-KIV = 1,5 mM

CoA-S-S-CoA und Pantetin (-S-S-) haben keine Wirkung auf die IPM-Synthaseaktivität (Tab. 14), ebenso nicht die Adenosin-5'-Phosphate (A-5'-MP, A-5'-DP, A-5'-TP), dagegen hemmt A-3'(2')-MP (5 mM) bei halbmaximaler Sättigung an den Substraten das Enzym auf 62 % und cyclisches A-3':5'-MP (5 mM) auf 73 %.

Auf Grund dieser Ergebnisse kann man annehmen, daß die Substratbindung nicht über den Cysteaminrest, sondern über die Pantethenylgruppe und den Adenosylrest, dabei auch über die 3'-Phosphatgruppe der Ribose, erfolgt. Die Bindung wird durch den S~Acyl-Rest erhöht und auch durch eine längere Acylkette anscheinend nicht verhindert (über die unspezifische Wirkung von Palmityl~SCoA s. Diskussion).

Tab. 14 Der Einfluß von CoA-SH-Analogen und Derivaten auf die IPM-Synthaseaktivität

Zusätze	M*	% Restaktivität KIV = 1,5 mM Ac~SCoA = 0,94 mM	% Restaktivität KIV = 0,375 mM Ac~SCoA = 0,094 mM
ohne	–	100	100
CoA-SH	4×10^{-5}	90,5	75
"	8×10^{-5}	64	54
3'-De-P-CoA-SH	$4,4 \times 10^{-5}$	101	80
"	9×10^{-5}	78,5	53,5
Pantethein(-SH)	$4,5 \times 10^{-5}$	95,5	93,5
"	9×10^{-5}	91,5	77
CoA-S-S-CoA**	2×10^{-3}	99	100
Pantetin(-S-S-)**	2×10^{-3}	100	99,5
N'-Acetyl-S-Acetacetyl-Cysteamin**	1×10^{-3}	–	100
	2×10^{-3}	100	100
Palmityl~SCoA	9×10^{-6}	7,9	0
(unspezif. s. Diskussion)***	9×10^{-5}	4,8	–
	$1,8 \times 10^{-4}$	0	–
S~Acetyl-Pantethein	6×10^{-5}	79	70
3'-De-Phospho-Acetyl~SCoA	1×10^{-4}	(95) wird umgesetzt, s. Abb. 42	

* bezogen auf die -SH-Bestimmung im DTNB-Test

** bezogen auf die Einwaage und Reinheitsgrad

*** bezogen auf die Konzentrationsbestimmung durch verzögerten Nitroproussid-Test

Es wurde der optische Test mit DTNB, pH = 8,0, wie unter Methoden beschrieben, verwendet.

4.10.2.2 Substratsättigung der Homologen

Es wurden nun verschiedene Acyl~SCoA-Ester nach SIMON und SHEMIN (1953) aus CoA-SH und den entsprechenden Säureanhydriden dargestellt, um sie auf ihre Substrateignung zu prüfen. Um eine Hemmung der IPM-Synthase im Test durch restliches freies CoA-SH auszuschließen, wurde dieses durch

äthanolische Jodlösung zum nicht hemmenden CoA-S-S-CoA oxydiert. Es zeigte sich, daß verschiedene Acyl~S-CoA-Ester von dem durch präparative Gelelektrophorese hoch gereinigten Enzym in Gegenwart von α-Ketosäuren umgesetzt wurden. Ohne α-Ketosäuren erfolgte keine enzymatische Spaltung der (ca. 1 mM) Thioesterbindung. Die Bindung wird jedoch durch den hohen pH-Wert des Testpuffers langsam hydrolysiert.
Um die Substratspezifität der IPM-Synthase genauer zu erfassen, wurde in einem weiteren Versuch geprüft, ob die Sättigung des Enzyms mit KIV durch Propionyl~ und Butyryl~SCoA im Vergleich zu Ac~SCoA verändert wird. Wie Abb. 43 A zeigt, wird die Bindung durch die unterschiedliche Länge des Thioesters nicht beeinflußt. Dies steht im Einklang damit, daß auch die Ac~SCoA-Konzentration das Maximum der KIV-Sättigung nicht ändert (s. III. 4.7.1). Aus Abb. 43 B geht weiterhin hervor, daß auch die Substratsättigung der homologen α-Ketosäuren (Pyruvat, α-Ketobutyrat) durch Propionyl~SCoA im Vergleich zu Acetyl~SCoA nicht verändert wird, dagegen aber das Verhältnis der Umsatzgeschwindigkeiten.
Um auszuschließen, daß es sich bei den genannten Reaktionen um testbedingte Artefakte handelt, wurde bei drei unterschiedlichen Acyl~SCoA / α-Ketosäurekombinationen jeweils gezeigt, daß die Umsatzgeschwindigkeit proportional zur eingesetzten Enzymmenge ist (Abb. 43 C), wenn die pH-bedingte Hydrolyse der Thioesterbindung berücksichtigt wird.

In den nächsten Versuchen wurde die Reaktionsgeschwindigkeit für vier bis fünf Konzentrationen an Propionyl~SCoA (Abb. 44 A u. B), Butyryl~SCoA (Abb. 44 C u. D), Valeryl~SCoA (Abb. 44 E), Malonyl~SCoA (Abb. 44 F und Tab. 15), Crotonyl~SCoA (Abb. 44 G u. H), ß-Hydroxybutyryl~SCoA und Acetacetyl~SCoA (Tab. 16) bei Sättigung mit den verschiedenen α-Ketosäuren bestimmt.
Für signifikante Extinktionsänderungen mußte bei einigen Verbindungen relativ wenig, und bei anderen viel Enzym eingesetzt werden. Um die Ergebnisse übersichtlicher darzustellen, wurden - unabhängig von den real gemessenen Geschwindigkeiten - die Werte auf eine einheitliche Enzymkonzentration umgerechnet dargestellt.

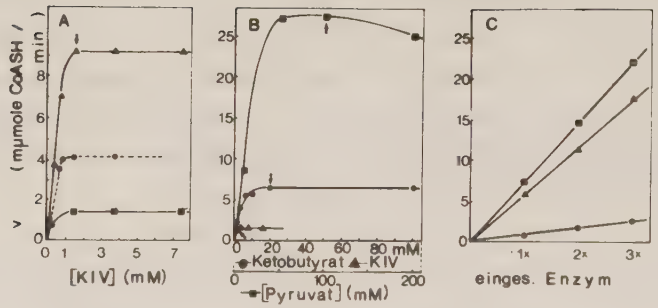


Abb. 43 A: Bestimmung der Substratsättigungskonzentration für KIV bei verschiedenen Acyl~SCoA-Verbindungen

DTNB-Test, pH = 8,0; Acetyl~SCoA: 0,69 mM, Butyryl~SCoA: 0,36 mM, Propionyl~SCoA: 0,48 mM. —▲— Ac~SCoA, —■— Propionyl~SCoA, —●— Butyryl~SCoA (10fach gestaucht).

B: Bestimmung der Substratsättigungskonzentration für verschiedene α-Ketosäuren mit Propionyl~SCoA

Der Pfeil ↓ gibt die Sättigungskonzentration für die α-Ketosäuren mit Acetyl~SCoA an. DTNB-Test mit 250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 8,0 bei 30° C. Propionyl~SCoA = 0,48 mM; die α-Ketosäuren wurden wie angegeben variiert. —▲— KIV, —●— α-Ketobutyrat, —■— α-Ketopropionat (Pyruvat).

C: Proportionalität für eingesetzte Enzymmenge im DTNB-Test für verschiedene Acyl~SCoA und α-Ketosäuren

DTNB-Test mit 250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 8,0 und 30° C. Die Substrate wurden wie folgt variiert: —■— Butyryl~SCoA = 0,7 mM/ Pyruvat = 100 mM; —▲— Ac~SCoA = 0,48 mM/KIV = 1,5 mM; —●— Valeryl~SCoA = 0,78 mM/ Pyruvat = 100 mM.

Eine experimentelle Bestimmung der Sättigungskonzentration für alle Acyl~SCoA-Verbindungen war auf Grund der zum Teil großen Hydrolysenrate der Thioesterbindung bei höheren Konzentrationen nicht möglich. Die starke Eigenabsorption verhinderte die Anwendung des optischen Testes bei 232 nm und damit eine Messung bei pH-Werten <8.0.

Unter der Voraussetzung, daß bei der Verwendung der verschiedenen

α-Ketosäuren die Affinität des Enzyms für die Acyl~SCoA-Verbindungen nicht oder nicht wesentlich beeinflußt wird, lassen sich aus den gemessenen Werten der Abbildungen 44 A - H in der Auftragung nach Lineweaver-Burk app. K_m-Werte ermitteln: Propionyl~SCoA: $1,1 \times 10^{-4}$ M (Abb, 44 A, B), Butyryl~SCoA: 4×10^{-4} M (Abb. 44 C, D), Crotonyl~SCoA: 8×10^{-4} M (Abb. 44 G, H), Malonyl~SCoA: $3,3 \times 10^{-4}$ M (Abb. 44 F).

Da die Substratsättigungen teilweise stärkere Abweichungen von einer Michaelis-Menten-Kinetik zeigen, geben die erhaltenen K_m-Werte nur die Größenordnung der Konzentration an, in der die halbmaximale Sättigung mit Acyl~SCoA bei gleichzeitiger Sättigung der α-Ketosäuren erfolgt.

In der Tab. 16 sind die Umsetzungsgeschwindigkeiten für Malonyl~SCoA mit den α-Ketosäuren (jeweils in der Sättigungskonzentration) im Verhältnis zur Umsetzung von Ac~SCoA und KIV (ebenfalls in der Sättigung) wiedergegeben (Spalte 1). KIV wird mit Malonyl~SCoA nur halb so schnell umgesetzt wie mit Ac~SCoA. α-Ketobutyrat und Pyruvat reagieren mit Malonyl~SCoA schneller als KIV mit Ac~SCoA.

Nur Pyruvat wird mit Malonyl~SCoA geringfügig schneller umgesetzt als mit Ac~SCoA (Spalte 2), während KIV und α-Ketobutyrat mit Malonyl~SCoA schlechter reagieren als mit Ac~SCoA.

Acetacetyl~SCoA (Tab. 15) wird allgemein sehr schlecht umgesetzt.

Tab. 15 Umsetzung von Acetacetyl~SCoA und α-Ketosäure

	mM	α-Ketosäure	mM	% Aktivität*
Acetacetyl~SCoA	0,84	KIV	1,5	<0,1
"	0,84	α-KB	20	6,2
"	0,42	α-KB	20	4
"	0,84	Pyruvat	100	7,5
"	0,42	"	100	5,2

* Bezogen auf die Umsetzung Ac~SCoA (0,69 mM) und α-KIV (1,5 mM)

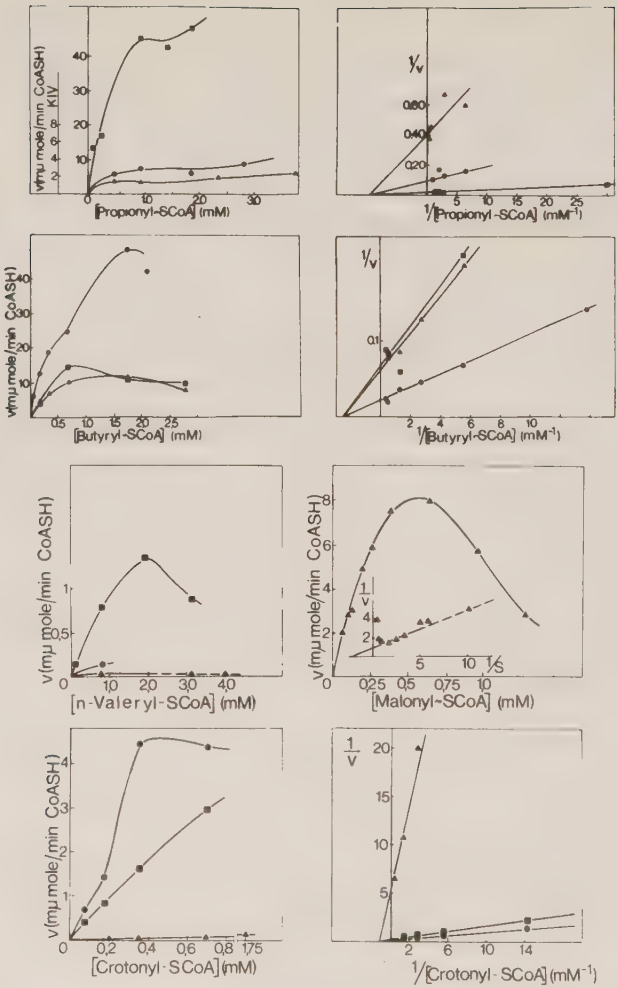


Abb. 44 Substratsättigung für Acyl~SCoA-Verbindungen mit verschiedenen α-Ketosäuren

Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten im DTNB-Test mit 250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 8,0 bei 30° C. Die Acyl~SCoA-Konzentration wurde wie angegeben variiert. —▲— KIV = 3,75 mM; —●— α-Ketobuttersäure = 20 mM; —■— Pyruvat = 100 mM.

Tab. 16 Umsetzung von Malonyl~SCoA und α-Ketosäure

Acyl~SCoA	mM	α-Ketosäure	mM*	$\frac{V_{max}\text{Malonyl~SCoA + α-Ketosäure}}{V_{max}\text{Ac~SCoA + α-KIV}}$	$\frac{V_{max}\text{Malonyl~SCoA + α-Ketosäure}}{V_{max}\text{Ac~SCoA + α-Ketos.}}$
Malonyl~SCoA	0,5	KIV	1,5	0,55	1
"	"	α-KnV	50	0,13	0,24
"	"	α-KB	20	1,7	0,45
"	"	Pyruvat	100	1,13	1,07
"	"	Glyoxylat	250	<0,01	–
"	"	α-KIC	10	<0,01	–

* Sättigungskonzentration

Aktivitätsbestimmung erfolgte im DTNB-Test mit 250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 8,0 bei 30° C. Substratkonzentrationen wie angegeben.

In Tab. 17 werden die gemessenen Umsetzungen auf Grund der aus den Lineweaver-Burk-Auftragungen ermittelten Daten verglichen.

Tab. 17 Substratspezifität der IPM-Synthase

Acyl~S-Coenzym A	gemittelter "K_m"-Wert (mM)	rel. v_{max}			
		KIV	α-KNV	α-KB	Pyruvat
Ac~SCoA	0,075	1	0,6	4	1
Propionyl~SCoA	0,11	0,25	<0,01	1	6
Butyryl~SCoA	0,4	1,5	-	5	1,6
Valeryl~SCoA	-	<0,01	-	(<0,1)	(0,2)
Malonyl~SCoA	0,5	0,6	0,1	2	1,2
Crotonyl~SCoA	0,9	(0,02)	-	1	0,5

rel. $v_{max} = v_{max} / v_{max}$ für Ac~SCoA und KIV

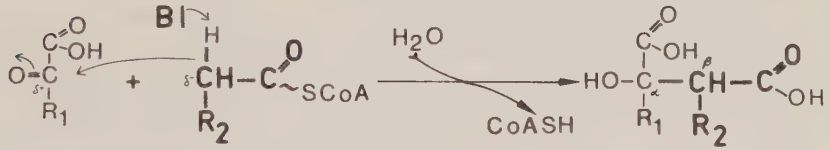
Acetyl~SCoA, Malonyl~SCoA und Butyryl~SCoA werden am schnellsten mit α-Ketobutyrat umgesetzt, während Propionyl~SCoA, Crotonyl~SCoA und Valeryl~SCoA mit der kürzeren α-Ketosäure Pyruvat am besten reagieren.

Eine Doppelbindung, stärker noch eine ß-Hydroxy- oder ß-Ketofunktion verringern die Umsatzgeschwindigkeit (Tab. 15), desgleichen wird durch eine endständige Säuregruppierung (Malonyl~SCoA) die Umsatzrate erniedrigt. Caproyl~SCoA wird in erfaßbarer Rate nicht mehr umgesetzt. Vereinfachend läßt sich feststellen, daß mit länger werdendem Acylrest des Coenzyms A die Reaktion mit den kürzeren α-Ketosäuren begünstigt wird. Auf Grund dieser Erkenntnis wurde erneut versucht, Glyoxylat durch die IPM-Synthase umzusetzen, und zwar diesmal mit Butyryl~SCoA und Valeryl~SCoA anstatt mit Ac~SCoA. Doch auch in dieser Kombination wurde Glyoxylat nicht umgesetzt. Dies bestätigt das Ergebnis früherer Versuche, daß diese Säure am katalytischen Zentrum des Enzyms nicht gebunden wird.

Schema 3

α-Ketosäure + Acyl~SCoA $\xrightarrow[+ H_2O \\ - CoA\text{-}SH]{\alpha\text{-IPM-Synthase}}$ α-Hydroxy, α, ß-substituierte Dicarbonsäuren

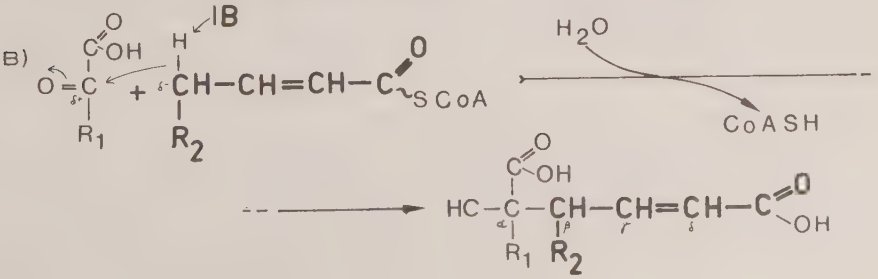
A)



eingesetzte α-Ketosäure	R_1
Pyruvat	a) CH_3-
α-Ketobutyrat	b) CH_3-CH_2-
α-Keto-n-Valerat	c) CH_3-$(CH_2)_2$-
α-Ketoisovalerat	d) CH_3>CH-, CH_3

eingesetztes Acyl~SCoA	R_2	möglicher R_1
Acetyl~SCoA	H-	a, b, c, d
Malonyl~SCoA	H-(-Cl_2H)	a, b, c, d
Propionyl~SCoA	CH_3-	a, b, d
Butyryl~SCoA	CH_3-CH_2-	a, b, d
Valeryl~ACoA	CH_3-$(CH_2)_2$-	a, b
ß-Hydroxybutyryl~SCoA	CH_3-CH(OH)-	a, b
Acetacetyl~SCoA	H_3C-C(=O)-	a, b
Crotonyl~SCoA (reagiert nach Formel B;	H	a, b, d

B)



4.10.3 Mögliche Produkte der unspezifischen IPM-Synthase-Reaktion

Mit den eingesetzten Acyl~SCoA-Verbindungen entstehen bei der Umsetzung mit der IPM-Synthase α-substituierte- und α, ß-substituierte Äpfelsäuren, sowie mit Crotonyl~SCoA α-substituierte, α-Hydroxy-Hexen (γ,δ)-Dicarbonsäuren. Die möglichen Reaktionen sind in Schema 4 wiedergegeben. Da die Kondensation mit Malonyl~SCoA unter gleichzeitiger oder anschließender Decarboxylierung verläuft, entstehen dieselben Produkte wie mit Ac~SCoA. Der Substituent am α-C-Atom (R_1) ergibt sich aus der eingesetzten α-Ketosäure, der am ß-C-Atom (R_2) aus dem Acyl-Rest des Coenzym A. Die Darstellung beruht auf dem anzunehmenden Mechanismus einer Aldoladdition, wie er für die Malat-Synthase nachgewiesen wurde (EGGERER und KLETTE, 1967). Ein direkter Nachweis durch eine Charakterisierung der entstandenen Produkte bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

4.10.4 Hemmbarkeit der Umsetzung der Homologen

Um zu zeigen, daß für die gemessenen Umsetzungen der verschiedenen Acyl~SCoA-Verbindungen und α-Ketosäuren die IPM-Synthase und nicht ein anderes Enzym verantwortlich ist, wurde die Hemmbarkeit dieser Reaktionen durch das Endprodukt der Biosynthesekette, L-Leucin, geprüft (Tab. 18, I). Dabei mußte wegen der Verwendung des optischen Tests mit DTNB die Hemmung bei pH = 8,0 und nicht im pH-Optimum für die Hemmung (pH = 7,3 - 7,4) untersucht werden.

Die Inhibition beträgt zwischen 38 % und 60 %, die der Reaktion von Ac~SCoA und KIV 62 %. Die verschieden starke Hemmung beruht wahrscheinlich auf dem - zwar nur geringen, aber unterschiedlichen - Einfluß der Substrate auf die Wirkung von L-Leucin.

Am Beispiel Valeryl~SCoA und Pyruvat, als den extremsten umgesetzten Substraten (längste Acyl~SCoA-Verbingung und kürzeste α-Ketosäure) wurde noch die Hemmung der Reaktion durch IPM geprüft (Tab. 18, II): es hemmt

Tab. 18 Hemmbarkeit der Acyl~SCoA-Umsetzungen

Acyl~SCoA	(mM)	α-Ketosäure	(mM)	Aktivität ohne Leucin $\Delta E_{412nm} \cdot 10^{-2}$/min	mit 5 mM Leucin $\Delta E_{412nm} \cdot 10^{-2}$/min	mit 5 mM Leucin %* Restaktivität
I						
Ac~SCoA	0,7	KIV	1,5	9	3,5	38
Propionyl~SCoA	0,45	Pyruvat	100	4,6	1,9	41
Butyryl~SCoA	0,36	KIV	3,75	4,6	2,5	53
Butyryl~SCoA	1,8	α-Ketobutyrat	20	15,5	6,1	40
Butyryl~SCoA	1,8	Pyruvat	100	4,8	3,0	62
Crotonyl~SCoA	0,7	Pyruvat	100	9,6	3,5	39
Crotonyl~SCoA	0,7	α-Ketobutyrat	20	20,3	9,5	47,5
Valeryl~SCoA	1,17	Pyruvat	100	1,4	0,7	50
				ohne IPM $\Delta E_{412nm} \cdot 10^{-2}$/min	mit 10 mM IPM $\Delta E_{412nm} \cdot 10^{-2}$/min	mit 10 mM IPM % Restaktivität
II						
Valeryl~SCoA	1,17	Pyruvat	100	1,45	0,8	55
Ac~SCoA	0,7	KIV	1,5	9	4,9	54,5

* Die Umsetzungsgeschwindigkeit mit der jeweiligen Acyl~SCoA und α-Ketoverbindung ohne Leucin wurde als 100 % gesetzt.

zu 44 %; bei Ac~SCoA und KIV als Substrate betrug der Wert 46 %. Damit wurde nochmals gezeigt, daß die beschriebenen Reaktionen von der IPM-Synthase katalysiert werden.

4.10.5 Umsetzung der Homologen in physiologischen Konzentrationen

Nachdem die prinzipielle Umsetzung der verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten von Acyl~SCoA-Verbindungen und α-Ketosäuren durch die IPM-Synthase nachgewiesen worden war, stellte sich die Frage, ob diese Reaktionen eine physiologische Bedeutung haben könnten besonders nachdrücklich, da die angewendeten Konzentrationen zum großen Teil in der Zelle gar nicht vorliegen können. Außerdem beeinflussen die sogenannten "natürlichen" Substrate KIV und Ac~SCoA jede Umsetzung anderer Substrate durch die IPM-Synthase, da die $K_{0,5}$-Werte und die app. K_m-Werte für die Homologen größer sind.

Um die Frage nach der physiologischen Relevanz der gefundenen Unspezifität besser beantworten zu können, wurden die Homologen noch einmal in einem Bereich, der physiologisch realisierbar erscheint, eingesetzt; danach wurde die Wirkung von KIV auf die Umsetzung geprüft. Dabei wurde KIV in einer Konzentration eingesetzt, die etwas über dem $K_{0,5}$-Wert liegt: $7,5 \times 10^{-5}$ M.

Als Anhaltspunkt für physiologisch mögliche Konzentrationen der Homologen dienten die Ergebnisse der Poolgrößenbestimmung von CoA-SH und Pyruvat in E. coli (LOWRY et al., 1971) und von Pyruvat in H. eutropha Stamm H 16 (AHRENS, 1970; COOK, unveröffentlicht). Die angegebenen Werte liegen für CoA-SH unter 0,5 mM und für Pyruvat um 1 mM. W. AHRENS fand eine kurzzeitige Erhöhung für Pyruvat auf 8 mM.

Es wurde daher für die Acyl~SCoA-Verbindungen eine Konzentration von ungefähr 0,5 mM und für die α-Ketosäuren von 2 mM gewählt.

In der Tabelle 19 sind die mit den Homologen in Abwesenheit von KIV gemessenen Geschwindigkeiten (1. Spalte) in Prozenten (2. Spalte) der Reaktion mit 0,475 mM Ac~SCoA und 1,5 mM KIV angegeben. Zum Vergleich ist jeweils auch die Umsetzung der Acyl~SCoA-Verbindung mit 1,5 und $7,5 \times 10^{-2}$ mM KIV aufgeführt. Aus den erhaltenen Werten ist zu ersehen, daß eine Umsetzung mit Ac~SCoA und Pyruvat als Substraten in Abwesenheit von KIV sehr gering, aber nicht auszuschließen ist. Diese Reaktion

wird von REH (unveröffentl. Ergebnisse) für eine veränderte L-Isoleucin-Synthese in Revertanten auxotropher Mutanten verantwortlich gemacht. Unter physiologischen Bedingungen unwahrscheinlich ist die enzymatische Reaktion von Propionyl~SCoA mit α-Keto-n-valerat, von Valeryl~SCoA mit KIV sowie Pyruvat sowie von Acetacetyl~SCoA mit KIV und Pyruvat. Die anderen Homologen müßten nach diesen Ergebnissen auch in der Zelle in Abwesenheit von KIV umgesetzt werden können.

In der 3. Spalte ist die Reaktion mit den Homologen in Gegenwart von $7,5 \times 10^{-5}$ M KIV angegeben. Die Reaktion der Acyl~SCoA-Verbindungen mit $7,5 \times 10^{-5}$ M KIV wird durch einige analoge Ketosäuren verringert, was darauf hinweist, daß auch mit diesen eine geringe Umsetzung abläuft. Die Umsetzungen der Acyl~SCoA-Verbindungen mit α-Ketobuttersäure sowie von Propionyl~SCoA mit Pyruvat weisen höhere Umsatzgeschwindigkeiten in der Größe der "natürlichen Reaktion" (Ac~SCoA mit $7,5 \times 10^{-5}$) auf und können daher auch mit einer größeren Wahrscheinlichkeit in Gegenwart von KIV in der Zelle ablaufen. In Gegenwart höherer KIV- und Ac~SCoA-Konzentrationen ist die "natürliche Synthese" sicherlich die bevorzugte Reaktion.

4. 11 Einfluß von Aminosäuren auf die IPM-Synthase-Aktivität

4. 11. 1 Hemmung der IPM-Synthase-Aktivität durch das Endprodukt L-Leucin

Bei allen bisher untersuchten IPM-Synthasen wirkt das Endprodukt der Biosynthesekette --L-Leucin-- als Inhibitor der Enzymaktivität, z. B. bei der IPM-Synthase aus Mais (OAKS, 1965), aus Salmonella (KOHLHAW et al., 1969), aus Pseudomonas (RABIN et al., 1968), aus Hefen (SAI et al., 1969) und aus Micrococcus (FISHER, 1973). HILL wies die Hemmung durch L-Leucin auch für die IPM-Synthase aus H. eutropha im Rohextrakt nach. Im folgenden wird die Hemmung durch L-Leucin für das gereinigte Enzym aus H 16 - A 81 näher charakterisiert.

Tab. 19 Umsetzung der Homologen bei physiologisch möglichen Konzentrationen in An- und Abwesenheit von KIV

Substrate				Aktivität		
Acyl~SCoA	(mM)	α-Ketosäure (mM)	(mM)	ohne zusätzl. KIV $\Delta E_{412nm} \cdot 10^{-2}$/min	%	mit $7,5 \times 10^{-5}$ M KIV $\Delta E_{412nm} \cdot 10^{-2}$/min
Acetyl~SCoA	0,475	KIV	1,5	33,5	100	–
"	"	"	$7,5 \times 10^{-2}$	16,8	52	–
"	"	α-Keto-n-valerat	2	7,8	23,3	13,4
"	"	α-Ketobutyrat	2	47	140	36
"	"	Pyruvat	2	1,65	4,95	12,2
Propionyl~SCoA	0,48	KIV	1,5	4	11,9	–
"	"	"	$7,5 \times 10^{-2}$	2,2	6,6	–
"	"	α-Keto-n-valerat	2	<0,2	<0,1	1,2
"	"	α-Ketobutyrat	2	17,5	52,5	11,9
"	"	Pyruvat	2	10	4,8	4,7
Butyryl~SCoA	0,51	KIV	1,5	3,0	9,2	–
"	"	"	$7,5 \times 10^{-2}$	1,2	3,6	–
"	"	α-Ketobutyrat	2	4,6	22,6	4,2
"	"	Pyruvat	2	1,6	4,8	1,2
Valeryl~SCoA	0,545	KIV	1,5	<0,2	<0,5	–
"	"	Pyruvat	2	0,5	1,5	0,1
Malonyl~SCoA	0,52	KIV	1,5	9	27	–
"	"	"	$7,5 \times 10^{-2}$	4,8	14,3	–
"	"	α-Ketobutyrat	2	19,4	58,0	15
"	"	Pyruvat	2	1,5	4,5	3,4
Crotonyl~SCoA	0,525	KIV	1,5	12,5	37,4	–
"	"	α-Ketobutyrat	2	21	63	16,5
"	"	Pyruvat	2	0,8	2,4	3,6
Acetacetyl~SCoA	0,525	KIV	1,5	<0,2	<0,1	–
"	"	α-Ketobutyrat	2	5,3	15,8	2,8
"	"	Pyruvat	2	<0,2	<0,1	–

4. 11. 1. 1 pH-Abhängigkeit der Hemmung durch L-Leucin

In Abb. 45 ist die Abhängigkeit der Hemmung durch 0,05 mM und 0,2 mM L-Leucin vom pH-Wert in $(K,H)_3$-PO_4-Puffer und in TRIS/HCl-Puffer wiedergegeben. Eine Abhängigkeit der Hemmung vom Puffersystem wurde nicht gefunden.

Eine maximale Hemmung trat bei pH = 7,3/7,4 (Abb. 55 B) auf. Beim pH-Optimum für das katalytische Zentrum, pH = 8,2, war das Enzym verhältnismäßig unempfindlich gegen den Inhibitor. Die starke Steigerung der der Hemmung im pH-Bereich zwischen pH = 7 und pH = 8 wurde auch für die Enzyme aus anderen Organismen gefunden (WEBSTER und GROSS, 1965; KOHLHAW et al., 1969; ULM et al., 1972). In diesem pH-Bereich liegt der pH-Wert von Imidazolgruppen im Protein, so daß man vermuten kann, daß durch die Titration von Histidin im Protein das Leucin-bindende Zentrum beeinflußt wird.

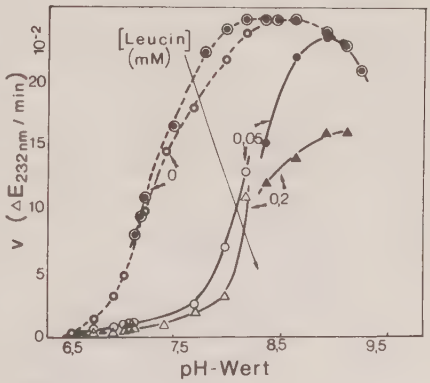


Abb. 45 Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Wasserstoffionen-Konzentration in Gegenwart von L-Leucin

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im optischen Test bei 232 nm bei 30° C. Der pH-Wert wurde wie angegeben variiert.
KIV = 0,75 mM; Ac SCoA = 0,188 mM; 250 mM TRIS/HCl-Puffer (---◉---), mit 0,05 mM (—●—) und 0,2 mM L-Leucin(–▲–) 250 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer (--o---) mit 0,05 mM (— o —) und 0,2 mM L-Leucin (–△–).

4.11.1.2 Hemmung durch L-Leucin in Abhängigkeit der Konzentration unter verschiedenen Bedingungen

Bei der IPM-Synthase aus N. crassa (WEBSTER und GROSS, 1965) war für L-Leucin ein Wechsel vom kompetitiven zum gemischten Hemmtypus bei Änderung des pH-Wertes gefunden worden. Es wurde daher die Hemmung für die IPM-Synthase aus H 16 - A 81 bei verschiedenen pH-Werten und bei verschiedenen Substrat(KIV)-/(Ac~SCoA)-Konzentrationen bestimmt (Abb. 46 bis 49).

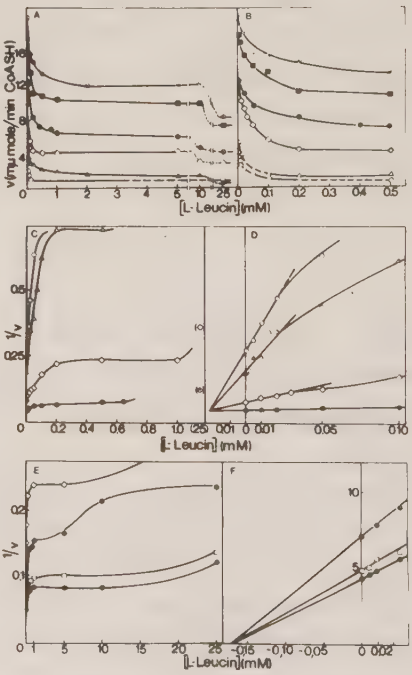


Abb. 46 Hemmung der IPM-Synthase durch L-Leucin bei pH = 8,1 und verschiedenen Substratkonzentrationen in Abhängigkeit der Inhibitorkonzentration

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im DTNB-Test in 250 mM Tris/HCl-Puffer bei 30° C. Die Leucinkonzentration wurde wie angegeben variiert.

A: Auftragung der Hemmung bis 25 mM L-Leucin im v/I-Diagramm
B: Auftragung der Hemmung im Bereich von 0,01 bis 0,5 mM
C: Dixon-Auftragung von Abb. 46 A für verschiedene Ac~SCoA-Konzentrationen
D: Dixon-Auftragung von Abb. 46 B für verschiedene Ac~SCoA-Konzentrationen
E: Dixon-Auftragung von Abb. 46 A für verschiedene KIV-Konzentrationen
F: Dixon-Auftragung von Abb. 46 B für verschiedene KIV-Konzentrationen

—◉—KIV = 1,5 mM; Ac~SCoA = 0,705 mM; —■—KIV = 0,375 mM; Ac~SCoA = 0,705 mM; —●—KIV = 0,0375 mM; Ac~SCoA = 0,705 mM; —▲—KIV = 0,0375 mM; Ac~SCoA = 0,141 mM; —◇—KIV = 1,5 mM; Ac~SCoA = 0,141 mM; —○—KIV = 1,5 mM; Ac~SCoA = 0,047 mM.

Die Werte wurden nach Dixon (1/v gegen I) aufgetragen (Abb. 46 C-F, 47 B, 48 B,C, 49 B). Die Dixon-Auftragungen verdeutlichen, daß die Hemmung nicht direkt proportional zur Leucinkonzentration verläuft; so zeigt L-Leucin bei pH = 7,6 stärkere "homotrope" Effekte, wie aus den aufkrümmenden Kurven in Abb. 48 B abzulesen ist (MAHLER und CORDES, Kap. 6). Die in der Dixon-Auftragung homotrop erscheinenden Effekte können auch auf heterotropen Effekten beruhen.

Für geringere Leucinkonzentrationen, bei denen die kooperativen Wechselwirkungen vernachlässigt werden können, ergibt sich ein nicht kompetitiver Hemmechanismus gegenüber KIV (Abb. 46 C) und ein kompetitiver gegenüber Ac~SCoA bei pH = 8,2 (Abb. 46 B), bei pH = 7,35 (Abb. 49 B) und bei pH = 7,6 (Abb. 48 B).

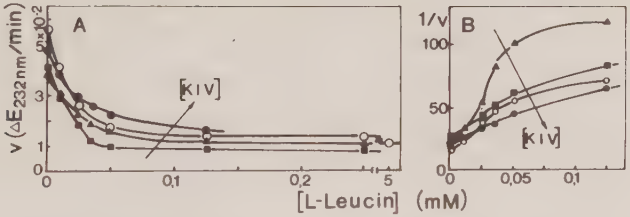


Abb. 47 Hemmung der IPM-Synthase durch L-Leucin bei pH = 7,6 und verschiedenen Substrat(KIV)-Konzentrationen

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im optischen Test bei 232 nm in 250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 7,6 und bei 30° C; Ac~SCoA = 0,072 mM; KIV = 1,5 mM (—●—), KIV = 0,75 mM (—○—), KIV = 0,375 mM (—▲—), KIV = 0,075 mM (—■—).

A: Auftragung im v/I-Diagramm B: Auftragung nach Dixon

Die ermittelten K_i-Werte für L-Leucin im Bereich bis 0,05 mM betragen:

"kompetitiv" gegenüber Ac~SCoA: $2,5 \times 10^{-5}$ M (pH = 8,1)
2×10^{-5} M (pH = 7,6)
1×10^{-6} M (pH = 7,35)

"nicht kompetitiv" gegenüber KIV: 2×10^{-4} M (pH = 8,1).

Bei pH = 7,6 ergab sich kein gemeinsamer Schnittpunkt für die Hemmkurven

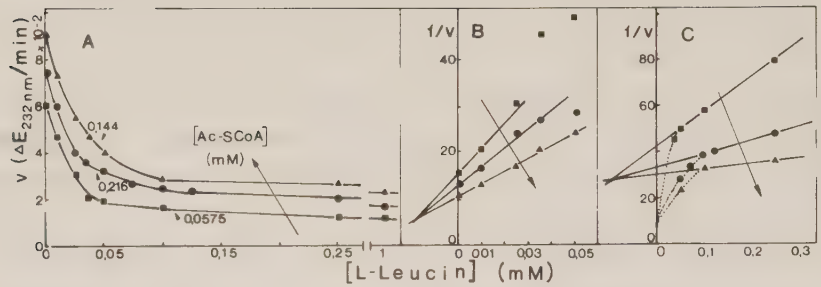


Abb. 48 Hemmung der IPM-Synthase durch L-Leucin bei pH = 7,6 und verschiedenen Substrat(Ac~SCoA)-Konzentrationen

Test wie bei Abb. 47; KIV = 1,5 mM; Ac~SCoA = 0,216 mM (Substrathemmung) (—●—), Ac~SCoA = 0,144 mM (—▲—), Ac~SCoA = 0,0575 mM (—■—).

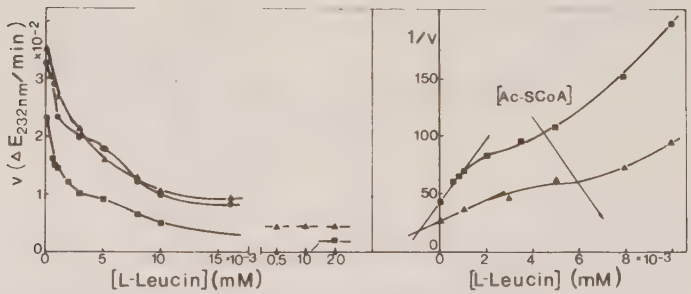


Abb. 49 Hemmung der IPM-Synthase durch L-Leucin bei pH = 7,35 in Abhängigkeit von der Konzentration

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im optischen Test bei 232 nm mit 250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 7,35 (pH-Optimum für die Hemmung) bei 30° C. Die Leucinkonzentration wurde wie angegeben variiert. —▲—KIV = 0,75 mM, Ac~SCoA = 0,141 mM;—●—KIV = 0,15 mM, Ac~SCoA = 0,141 mM;—■—KIV = 0,75 mM, Ac~SCoA = 0,188 mM.

mit unterschiedlichen Substrat(KIV)-Konzentrationen (Abb. 47 B).

Für Leucinkonzentrationen oberhalb von 0,05 mM ergab sich ein K_i-Wert von 1×10^{-4} M (pH = 7,6), wobei der Hemmechanismus gegenüber Ac~SCoA

(Abb. 48 C) einer kompetitiven Hemmung entspricht. Der teilweise nicht kompetitive Hemmechanismus durch L-Leucin gegenüber dem strukturähnlichen Substrat KIV und der teilweise kompetitive Hemmechanismus gegenüber dem Leucin-strukturfremden Substrat Ac~SCoA zeigten, daß L-Leucin unter diesen Bedingungen wahrscheinlich an einem allosterischen Zentrum und nicht am katalytischen Zentrum angreift (KOHLHAW et al., 1969), so daß L-Leucin als ein allosterischer Inhibitor anzusprechen ist.

Die K_i-Werte verdeutlichen weiterhin, daß L-Leucin bei niedrigen pH-Werten besser gebunden wird als bei hohen. Bei pH = 7,35 liegt der $K_{i/0,5}$-Wert, bezogen auf die maximale Hemmung, zwischen 3×10^{-6} M und 6×10^{-6} M, je nach Substratkonzentrationen; bei pH = 8,1 verringert er sich von $2,5 \times 10^{-4}$ M (für Substratsättigung) auf $2,5 \times 10^{-5}$ M bei geringen Substratkonzentrationen. Die Differenzen zwischen den ermittelten K_i- und $K_{i/0,5}$-Werten können durch die substratinduzierten Konformationsumwandlungen des Enzyms und durch homotrope bzw. heterotrope Effekte des Leucin erklärt werden. Ein Beispiel für den Einfluß der verschiedenen Faktoren sind die Kurven der Abb. 47 B mit hoher (Substrathemmung) und niedriger ($< K_m$-Wert) Substrat(KIV)-Konzentration, die anders verlaufen als die für mittlere Konzentrationen.

Der Einfluß von L-Leucin auf die Substratsättigungskurven wird im Zusammenhang mit der Wirkung von L-Valin und L-Isoleucin beschrieben.

Aus Abb. 46 A und 49 A ist zu ersehen, daß hohe Leucinkonzentrationen (25 mM) bei pH = 8,1 und pH = 7,6 die Hemmung zwar erhöhten, daß aber keine Hemmung von 100 % erreicht wurde. Bei Substratsättigung für KIV (1,5 mM) und für Ac~SCoA (0,75 mM) wurde eine Hemmung von 59 % erreicht, durch Erniedrigung der Substrat(KIV)-Konzentration erhöhte sich die Hemmung auf 66 %, durch Erniedrigung der Ac~SCoA-Konzentration auf 77 - 78 %. Eine 90 %ige Hemmung wurde aber erst durch Substratkonzentrationen unterhalb der app. K_m-Werte erreicht. Daraus wird ersichtlich, daß bei höheren Leucin-Konzentrationen die Hemmung auch gegenüber KIV teilweise aufhebbar ist.

Dies kann auf eine zusätzliche Bindung von L-Leucin am katalytischen Zentrum zurückgeführt werden; diese Vorstellung wird auch durch eine gefundene Hemmung durch hohe Leucinkonzentrationen an einer sonst für L-Leucin insensitiven IPM-Synthase aus einer Trifluorleucin-resistenten Mutante unterstützt. (Die Isolierung der Mutante ist unter II.4 beschrieben.)
Im Gegensatz zu pH = 8,1 wurde bei pH = 7,35 (Abb. 49 A) die durch 0,5 mM L-Leucin erreichte Hemmung durch 25 mM L-Leucin nicht mehr erhöht, so daß die maximale Hemmung des Enzyms bei diesem pH-Wert schon bei physiologischen Konzentrationen erfolgte (vgl. Diskussion über den intrazellulären pH-Bereich).

Bei den Auftragungen der Werte aus Abb. 46 A und 49 A nach der modifizierten Hill-Gleichung für die Hemmung (Abb. 50 und 51) ergaben sich Hill-Koeffizienten zwischen $n_H' = 0,6$ und $n_H' = 2$; man kann also mindestens zwei Bindungsstellen für L-Leucin erwarten. Zwei Bindungsstellen für L-Leucin wurden auch für das Enzym aus S. typhimurium (KOHLHAW et al., 1969) und aus Saccharomyces spec. (ULM et al., 1972) postuliert.
Die höchsten n_H'-Werte und damit starke kooperative Wechselwirkungen wurden bei pH = 8,1 für niedrige Leucinkonzentrationen bei Substratkonzen-

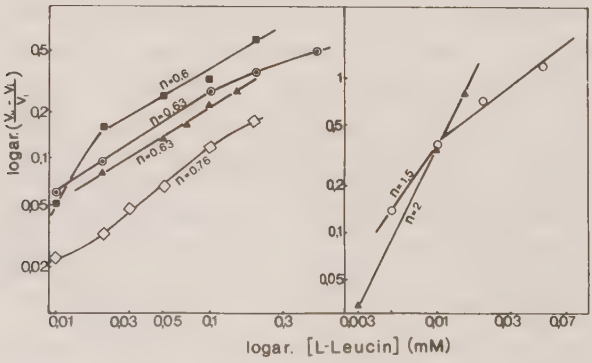


Abb. 50 Hill-Auftragung zu Abb. 46

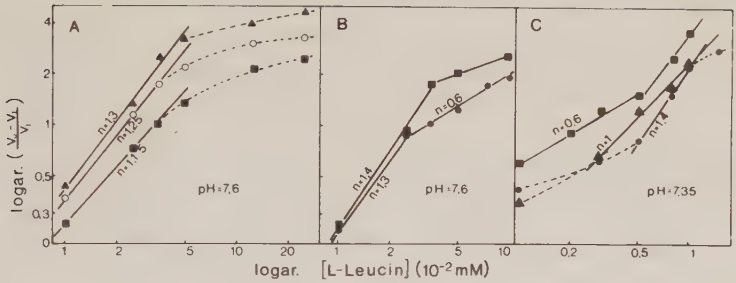


Abb. 51 A: Hill-Auftragung zu Abb. 47
B: Hill-Auftragung zu Abb. 48
C: Hill-Auftragung zu Abb. 49

trationen erhalten, bei denen jeweils ein Substrat in geringerer als halbmaximaler Substratsättigung vorlag. Bei hohen Substratkonzentrationen ergaben sich dagegen Werte von $n_H' = 0,6$ bis $n_H' = 0,76$. Bei pH = 7,6 wurden mittlere Werte von $n_H' = 1,15$ bis $n_H' = 1,4$ erhalten; bei pH = 7,35 stieg der Hillkoeffizient mit Erhöhung der Leucinkonzentration von 0,001 auf 0,01 mM von $n_H' = 0,6$ auf $n_H' = 1,5$ an.
Diese Änderungen des Koeffizienten verdeutlichen noch einmal die kooperativen Wechselwirkungen des L-Leucin und die Verknüpfung der Wirkungen des L-Leucin mit denen der Substrate.

4. 11. 2 Die Wirkung verschiedener Aminosäuren auf die Enzymaktivität in An- und Abwesenheit von L-Leucin

Die Biosynthese von Aminosäuren wird in einigen Organismen nicht nur durch das eigene Endprodukt reguliert, sondern es greifen auch Aminosäuren anderer Biosynthesewege in die Regulation ein. So wurde mehrfach gezeigt, daß L-Leucin in anderen Synthesewegen einen regulatorischen Einfluß hat (JENSEN, 1969; PATTE et al., 1965; PIZER und POTOCHNY, 1964). Für die übergreifende Regulation von Endprodukten in anderen

Syntheseketten prägte JENSEN (1969) den Begriff "metabolic interlock".

Durch Zusatz verschiedener Aminosäuren zum Test wurde geprüft, inwieweit diese die Leucinbiosynthese durch Hemmung oder Aktivierung der IPM-Synthase-Aktivität beeinflussen. Außer L-Leucin, dem Endprodukt der Biosynthesekette, zeigte keine der natürlichen Aminosäuren (pH = 8,1/ 10 mM; pH = 7,5 / 1 mM) eine stärkere Wirkung auf die Enzymaktivität. Den stärksten Einfluß hatten noch L- und auch D-Histidin (10 %ige Hemmung). Dagegen zeigten einige Aminosäuren einen Einfluß auf das durch L-Leucin gehemmte Enzym (Tab. 20).

Tab. 20 Die Wirkung von Aminosäuren auf die durch L-Leucin gehemmte IPM-Synthase

Aminosäure	pH = 8,1* mM	$\frac{\Delta E_{412nm} \times 10^{-2}}{min}$	% Hemmung	pH = 7,4** mM	$\frac{\Delta E_{232nm} \times 10^{-2}}{min}$	% Hemmung
-	-	17	37	-	4	86
L-Alanin	10	20	26	1	7,5	73
L-Threonin	10	12	55,5	1	5	82
L-Methionin	10	19	29,5	1	7,5	73
L-Histidin	10	10	63	1	3	90
D-Histidin	-	-	-	1	3	90
L-Isoleucin	-	-	-	1	14	50
D-Isoleucin	10	16	40	1	4	86
L-Valin	-	-	-	1	17	34,5
D-Valin	10	17	37	1	4,5	84
L-Phenylalanin	-	-	-	1	7,5	73

* Die Aktivität wurde bei pH = 8,1 im DTNB-Test mit 250 mM TRIS/HCl-Puffer bei 30° C bestimmt; KIV = 0,75 mM; Ac~SCoA = 0,15 mM; L-Leucin = 5 mM. Die Reaktion wurde durch Zugabe des ca. 60fach angereicherten Enzyms gestartet. 0 % Hemmung entsprach einem $\Delta E_{412nm}/min = 27 \times 10^{-2}$.

** Die Aktivität wurde bei pH = 7,4 im optischen Test bei 232 nm mit 250 mM TRIS/HCl-Puffer bei 35° C bestimmt; KIV = 0,75 mM; Ac~SCoA = 0,094 mM; L-Leucin = 0,05 mM. Die Reaktion wurde durch das ca. 100fach angereicherte Enzym gestartet. 0 % Hemmung entsprach einem $\Delta E_{232nm}/min = 28 \times 10^{-3}$.

Keinen Einfluß hatten: L-Glycin, L-Serin, L-Tryptophan, L-Prolin, L-Tyrosin, L-Asparagins, L-Arginin, L-Lysin und D-Homoserin.

Die geringe Aufhebung der durch 0,05 mM L-Leucin hervorgerufenen Hemmung durch L-Phenylalanin, L-Alanin und L-Methionin (ca. 10 - 15 %) ist sicherlich ohne physiologische Bedeutung, desgleichen die verstärkte Hemmung durch 10 mM L-Threonin bei pH = 8,1.

Für den Einfluß von Histidin wird auf Grund der eingesetzten Konzentrationen und der gleichstarken Reaktion von L- wie D-Histidin bei pH = 7,4 eine unphysiologische Detergenzwirkung angenommen. Da die Titration des proteineigenen Histidin evtl. für die pH-Abhängigkeit der Hemmung durch L-Leucin verantwortlich gemacht werden kann, wird in diesem Zusammenhang vermutet, daß das zugesetzte Histidin anstelle des proteineigenen mit Proteinketten in Wechselwirkung tritt und dadurch das Enzym inaktiviert. Durch die Annahme einer zeitabhängigen Inaktivierung ist auch die viel stärkere Wirkung von Histidin im fluorimetrischen Test mit 20 min Inkubationsdauer zu erklären (50 % Hemmung durch L-Histidin in Abwesenheit und 96 % Hemmung in Anwesenheit von L-Leucin).

Die Aktivierung des durch L-Leucin gehemmten Enzyms durch L-Valin und L-Isoleucin, wobei die D-Aminosäuren kaum einen Einfluß hatten, scheint dagegen für die Regulation der IPM-Synthase von Bedeutung zu sein. Da L-Valin und L-Isoleucin strukturverwandte Aminosäuren und außerdem die Endprodukte der gemeinsamen verzweigten Biosynthesekette sind, ist die Wirkung dieser Aminosäuren nicht unter "metabolic interlock" einzuordnen.

Um die Spezifität der Reaktivierung durch L-Valin und L-Isoleucin zu prüfen, wurde der Einfluß strukturanaloger Aminosäuren auf die Aktivität des durch L-Leucin gehemmten und ungehemmten Enzyms gemessen (Tab. 21).

Wie aus der Tabelle hervorgeht, bewirkte L-Leucinamid eine signifikante Hemmung; die Säurefunktion scheint also für die Bindung von L-Leucin nicht wesentlich zu sein. Nur Cyclo-Leucin, α-Aminobuttersäure und α-Aminovaleriansäure (Nor-Valin) bewirkten neben L-Isoleucin und L-Valin eine stärkere Aufhebung der Hemmung, wobei L-Valin die größte Wirkung zeigte.

Tab. 21 Die Wirkung von strukturanalogen Aminosäuren des Leucin auf die IPM-Synthase-Aktivität

Aminosäure (1 mM)	ohne L-Leucin % Restaktivität	+ 5 x 10^{-5} M L-Leucin % Restaktivität
-	100	14,3
L-Leucinamid	36,6	12,9
Cyclo-Leucin	100	50
Allo-Isoleucin	93	16,4
DL-Isoleucinmethylester	100	26
L-Isoleucin	100	50
D-Isoleucin	-	14,3
L-Valin	100	65,5
D-Valin	96,5	16
DL-α-Aminobuttersäure	-	41
γ-Aminobuttersäure	100	21,4
DL-α-Aminovaleriansäure	91	46,5
DL-α-Aminocaprylsäure	100	26,8

Die Aktivität wurde bei pH = 7,4 im optischen Test bei 232 nm mit 250 mM TRIS/HCl-Puffer bei 35° C bestimmt. KIV = 0,75 mM, Ac~SCoA = 0,094 mM.

4.11.3 Die Wirkung von L-Valin und L-Isoleucin

L-Valin und L-Isoleucin hatten nur noch in Micrococcus denitrificans eine ähnlich starke Wirkung wie in H. eutropha H 16 (HILL, 1968; FISCHER, 1973). Im folgenden wird der Einfluß dieser Aminosäuren auf die Aktivität der IPM-Synthase aus H 16 - A 81 beschrieben.

4.11.3.1 Die Wirkung von L-Valin und L-Isoleucin auf die Enzymaktivität ohne Zusatz von L-Leucin

HILL (1968) hatte bei Verwendung eines unbehandelten Rohextraktes aus H. eutropha H 16 -vi 43 durch Zugabe von L-Valin eine Aufhebung der Hemmung durch L-Leucin bzw. eine Aktivierung des Enzyms bis auf 120 % gefunden.

Auch im Rohextrakt aus H 16 - A 81, der durch eine Gelfiltration mit Sephadex G 25 von niedermolekularen Bestandteilen befreit worden war, wurde bei pH = 7,5 eine Aktivierung durch L-Valin auf 150 % gefunden. Doch konnte im hochangereicherten Enzym nach einer 12-stündigen Dialyse sowohl gegen 50 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 7,5 mit 0,1 mM KIV als Stabilisator als auch, parallel dazu, gegen 50 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH 7,5 mit 500 mM KCl keine aktivierende Wirkung von L-Valin festgestellt werden.
Der Rohextrakt konnte auf Grund der Instabilität des Enzyms und der Proteasenaktivität nicht dialysiert werden. Es wird angenommen, daß geringe Mengen von L-Leucin vom Enzym so fest gebunden wurden, daß diese durch eine Gelfiltration über Sephadex G 25 nicht entfernt worden waren;(für 5 ml Extrakt waren ca. 100 ml Gel verwendet worden, was der 7,5fachen Menge an Gel, die für eine Entsalzung nötig gewesen wäre, entsprach).
Auch im Rohextrakt der Mutante mit einer für L-Leucin nahezu insensitiven IPM-Synthase wurde keine Aktivierung durch L-Valin gefunden. Allerdings könnte die Unempfindlichkeit des Enzyms gegenüber L-Leucin auf dem Verlust der Fähigkeit zu einer allosterischen Reaktion beruhen.

Auch L-Isoleucin hatte bis zu 5 mM bei pH = 7,4 in Abwesenheit von L-Leucin keinen Einfluß auf das dialysierte Enzym (Abb. 53).

4.11.3.2 Der Einfluß von L-Valin und L-Isoleucin auf die durch L-Leucin gehemmte IPM-Synthase-Aktivität

Um den Einfluß von L-Valin und L-Isoleucin in Gegenwart von L-Leucin zu verdeutlichen, wurden die Aminosäuren in steigender Konzentration bis zu 25 mM bzw. 5 mM bei zwei Leucinkonzentrationen dem Testansatz zugegeben (Abb. 52 bzw. Abb. 53). Andererseits wurde bei konstanten Valinkonzentrationen (0,4 mM und 0,1 mM) die Leucinkonzentration bei pH = 7,4 zwischen 0 und 5×10^{-5} M variiert, um festzustellen, ob L-Valin die homotropen

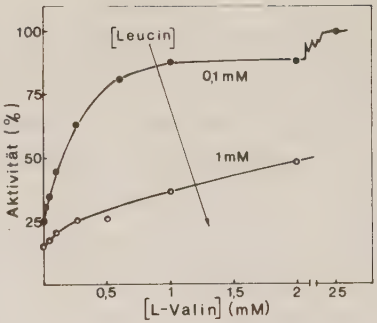


Abb. 52 Die Wirkung von L-Valin auf die durch L-Leucin gehemmte IPM-Synthase in Abhängigkeit der L-Valin-Konzentration

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im optischen Test bei 232 nm in 250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 7,65, bei 30° C. Die Substratkonzentrationen betrugen: KIV = 0,75 mM, Ac SCoA = 0,094 mM, die L-Valin-Konzentration wurde wie in der Abb. angegeben variiert. —●— in Gegenwart von 0,1 mM L-Leucin; —o— in Gegenwart von 1 mM L-Leucin. 100 % Aktivität entsprach einer Extinktionsänderung von ΔE_{232nm} = $6,6 \times 10^{-2}$ min^{-1}.

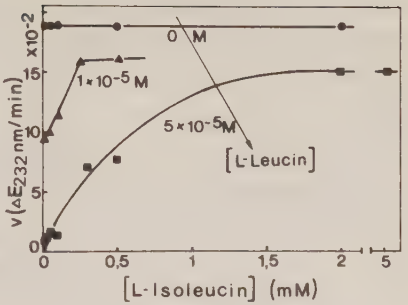
Effekte des L-Leucins aufhob (Abb. 54).

Durch steigende Konzentrationen an L-Valin und L-Isoleucin wurde die Hemmung zunehmend aufgehoben; die ungehemmte Reaktionsgeschwindigkeit wurde erst bei hohen Valin-Konzentrationen (25 mM) erreicht. Bei gleicher Konzentration von L-Valin und L-Leucin wurde bei 1 mM die Aktivität durch L-Valin von 15 % auf 34 %, bei 0,1 mM von 25 % auf 45 % erhöht, d.h. die Reaktionsgeschwindigkeit wurde ungefähr verdoppelt.

Durch die Zugabe von 5 mM L-Isoleucin wurde bei 5×10^{-5} M L-Leucin 86 % der ungehemmten Reaktion erreicht (Abb. 53).

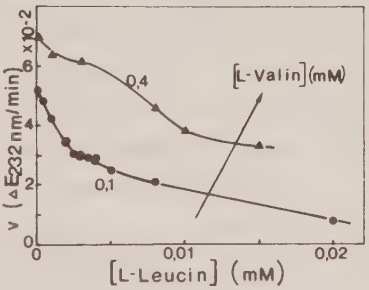
Die Wechselwirkungen des L-Leucin wurden durch L-Valin nicht aufgehoben, denn auch in Gegenwart des Aktivators wurde keine lineare Abhängigkeit der Hemmung von der Leucinkonzentration gefunden.

Abb. 53 Die Wirkung von L-Isoleucin auf die durch L-Leucin gehemmte IPM-Synthase in Abhängigkeit der L- Isoleucin-Konzentration



Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im optischen Test bei 232 nm in 250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 7,4 bei 30° C. Die Substratkonzentrationen betrugen: Ac~SCoA = 0,094 mM, KIV = 0,375 mM. L-Isoleucin wurde wie in der Abb. angegeben variiert.
—●—ohne L-Leucin; —▲— in Gegenwart von 0,01 mM L-Leucin; —■—in Gegenwart von 0,05 mM L-Leucin.

Abb. 54 Die Hemmung der IPM-Synthase durch L-Leucin in Gegenwart von L-Valin in Abhängigkeit der L-Leucinkonzentration



Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im optischen Test bei 232 nm in 250 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 7,4, bei 30° C. Die Substratkonzentrationen betrugen: KIV = 0,375 mM, Ac~SCoA = 0,094 mM. Die L-Leucin-Konzentration wurde wie in der Abb. angegeben variiert. Die L-Valin-Konzentration betrug 0,1 mM —●— und 0,4 mM —▲— .

4.11.3.3 Die Abhängigkeit der Wirkung von L-Valin von der Wasserstoffionenkonzentration

Die Wirkung von L-Valin auf die durch L-Leucin gehemmte IPM-Synthase war wie die Hemmung selbst vom pH-Wert abhängig. Durch die Gegenwart von L-Valin verschob sich das pH-Optimum für die Hemmung von pH = 7,4 auf pH = 7,0 (Abb. 55 B). Die stärkste Wirkung hatte L-Valin bei pH = 7,4/

7,5 (Abb. 55 C). Während L-Valin in TRIS/HCl-Puffer bei pH = 8,0 in Abwesenheit von L-Leucin keinen Einfluß auf die Enzymaktivität hatte, bewirkte es im Gegensatz zu L-Leucin bei pH-Werten über 8,5 eine zunehmende Hemmung.

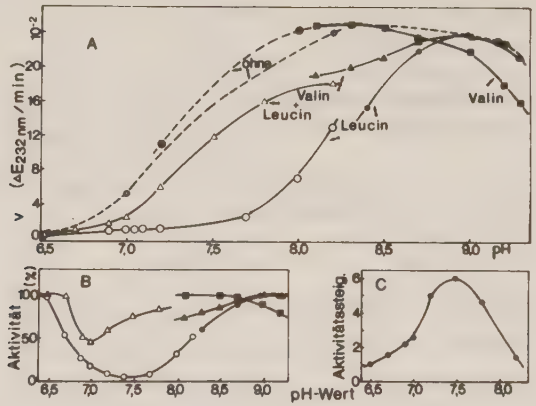


Abb. 55 Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Wasserstoffionenkonzentration in Gegenwart der Effektoren L-Leucin und L-Valin

A: Aufhebung der durch L-Leucin hervorgerufenen Hemmung mit L-Valin in Abhängigkeit des pH-Wertes und die Hemmung durch L-Valin bei pH = 8. Bedingungen wie unter Abb. 45 angegeben; zusätzlich: 0,05 mM L-Leucin + 2,5 mM L-Valin —▲— in 250 mM TRIS/HCl-Puffer, —△— in 250 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer; —■—2,5 mM L-Valin in 250 mM TRIS/HCl-Puffer.

B: Aktivität des Enzyms in Gegenwart der Effektoren L-Valin und L-Leucin in Prozenten der Aktivität ohne Effektoren

—●—250 mM TRIS/HCl-Puffer
—○—250 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer
für $\frac{v \text{ mit } 0{,}05 \text{ mM L-Leucin}}{v \text{ ohne L-Leucin}}$

—▲— 250 mM TRIS/HCl-Puffer
—△— 250 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer
für $\frac{v \text{ mit } 0{,}05 \text{ mM L-Leucin} + 2{,}5 \text{ mM L-Valin}}{v \text{ ohne Aminosäuren}}$

—■— 250 mM TRIS/HCl-Puffer für $\frac{v \text{ mit } 2{,}5 \text{ mM L-Valin}}{v \text{ ohne L-Valin}}$

C: Steigerung der Aktivität durch L-Valin bezogen auf die Aktivität des durch L-Leucin gehemmten Enzyms

—●—250 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer für $\frac{v \text{ mit } 0{,}05 \text{ mM L-Leucin} + 2{,}5 \text{ mM L-Valin}}{v \text{ mit } 0{,}05 \text{ mM L-Leucin}}$

4.11.4 Der Einfluß der Aminosäuren L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin auf die Enzymaktivität in Abhängigkeit der Substrat(KIV)-Konzentration

Von Interesse war auch der Einfluß der Aminosäuren L-Leucin, L-Isoleucin und L-Valin auf die Substrat(KIV)-Sättigungskurven. Dazu wurde in An- und Abwesenheit der Effektoren die Substrat(KIV)-Konzentration bei pH = 7,4 bzw. 7,6 von 0 bis 1,5 mM variiert (Abb. 56 und 57).
In Anwesenheit von L-Leucin waren die homotropen, kooperativen Effekte des Substrates KIV nur schwach zu erkennen. Deutlich war aber, daß die Hemmung durch L-Leucin durch steigende KIV-Konzentrationen nicht aufgehoben wurde. Durch die zusätzliche Gegenwart von L-Valin (Abb. 56) trat die Kooperativität des Substrates wieder deutlicher in Erscheinung. Aber auch durch die Zugabe von L-Valin wurde mit steigenden KIV-Konzentrationen die Geschwindigkeit der ungehemmten Reaktion nicht erreicht, obwohl es für den Substrat(KIV)-Bereich von 0,2 bis 0,8 mM so aussah, als ob die Hemmung kompetitiv sei (Abb. 56 B/C, Lineweaver-Burk-Auftragung). Auffallend war, daß bei einer Substrat(KIV)-Konzentration von 1,5 mM in Gegenwart von L-Valin eine verstärkte Substrathemmung gemessen wurde. Weiterhin ging aus der Substrat(KIV)-Sättigungskurve in An- und Abwesenheit der Effektoren (Abb. 56 A/B) hervor, daß sich der $K_{0,5}$-Wert von 6×10^{-5} M auf ca. $1,4 \times 10^{-4}$ M in Gegenwart von L-Leucin und L-Valin änderte. Da in Gegenwart von L-Leucin weder in Ab- noch in Anwesenheit von L-Valin die ungehemmte maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wurde, muß man sowohl für L-Leucin allein als auch mit L-Valin eine "gemischte Hemmung"annehmen.

Durch die Auftragung der Werte aus Abb. 56 A/B nach der Hill-Gleichung wurde deutlich, daß die positive Kooperativität für kleine (<0,01 mM) und größere (>0,075 mM) KIV-Konzentrationen mit $n_H = 2$ bis $n_H = 2,5$ in Abwesenheit von L-Leucin in eine negative Kooperativität mit $n_H = 0,82$ in Anwesenheit von L-Leucin überführt wurde. Für den mittleren Substrat(KIV)-

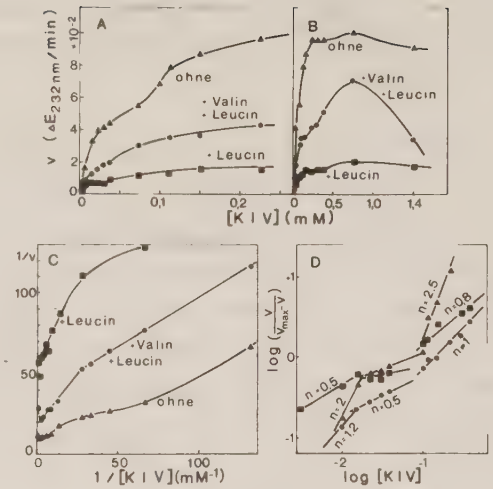


Abb. 56 Einfluß von L-Leucin und L-Valin auf die IPM-Synthase-Aktivität in Abhängigkeit der Substrat(KIV)-Konzentration

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im optischen Test bei 232 nm in TRIS/HCl-Puffer, pH = 7,6 bei 30° C. Ac~SCoA = 0,15 mM; KIV wurde wie in der Abb. angegeben variiert.

A: Substratsättigungskurve in An- und Abwesenheit von L-Leucin und L-Valin für den Substratbereich 0 - 0,2 mM KIV

B: wie A; für den Substratbereich von 0,1 - 1,5 mM KIV

C: Lineweaver-Burk-Auftragung zu Abb. 56 A/B

D: Hill-Auftragung zu Abb. 56 A/B

—▲—ohne Aminosäure; —■—mit 0,1 mM L-Leucin; —●—mit 0,1 mM L-Leucin + 0,25 mM L-Valin.

Konzentrationsbereich erniedrigte sich der Hill-Koeffizient von $n_H \sim 0,5$ auf $n_H < 0,1$.

Der R_S-Wert (s.III.4.7.1) für die Substratsättigung erhöhte sich von R_S = 50 (= 0,2 mM/ 0,004 mM) auf R_S = 200 (= 0,5 mM/ 0,0025 mM) in Gegenwart von L-Leucin. Im Einklang damit steht der hyperbolische Kurvenverlauf im Lineweaver-Burk-Diagramm für die Substrat(KIV)-Sättigungskurve in Gegenwart von L-Leucin. L-Leucin zeigt somit heterotrope Effekte mit antagonistischen Wechselwirkungen bezüglich des Substrates KIV.

Durch die Zugabe von L-Leucin und L-Valin erhöhten sich die Hill-Koeffizienten für den Anfangs- und den Endbereich der Substrat(KIV)-Sättigung auf n_H = 1,04 bis n_H = 1,14 und für den mittleren Substrat(KIV)-Sättigungsbereich auf n_H = 0,5. L-Valin bewirkte also ebenfalls heterotrope Effekte, die bezüglich des Substrates KIV kooperativ, bezüglich des Inhibitors

L-Leucin antagonistisch sind.

Auffallend war, daß die substratbedingten Konformationsumwandlungen - erkennbar an der Änderung der Hill-Koeffizienten - weder durch die Gegenwart von L-Leucin noch durch die von L-Leucin und L-Valin gemeinsam unterdrückt und auch nicht in höherem Maße bezüglich der Substratkonzentration verschoben wurden. Die negative Kooperativität für den mittleren Substratsättigungsbereich blieb auch in Gegenwart von L-Valin erhalten.

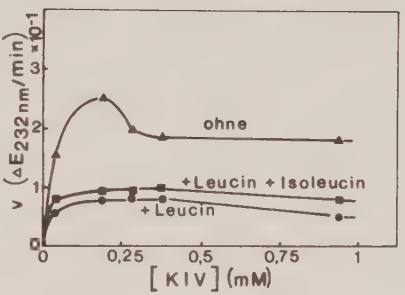


Abb. 57 Der Einfluß von L-Isoleucin auf die Enzymaktivität in Gegenwart von L-Leucin in Abhängigkeit der Substrat(KIV)-Konzentration

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im optischen Test bei 232 nm in 250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 7,4, bei 30° C. Ac~SCoA = 0,094 mM; die Substrat(KIV)-Konzentration wurde wie in der Abb. angegeben variiert. —▲—ohne Aminosäuren, —●—mit 0,02 mM L-Leucin;—■—mit 0,02 mM L-Leucin + 0,075 mM L-Isoleucin.

Die Wirkung von L-Isoleucin auf die Substrat(KIV)-Sättigung ist in Abb. 57 wiedergegeben. Auch durch die zusätzliche Anwesenheit von L-Isoleucin zu L-Leucin wurde die Substrat(KIV)-Sättigungskurve qualitativ nicht verändert. Die Hemmung durch L-Leucin wurde nur prozentual verringert.

4.12 Der Einfluß von Phosphatestern auf die IPM-Synthase-Aktivität

Um zu prüfen, ob eine direkte Beeinflussung der Biosynthese von L-Leucin durch energiereiche Verbindungen und Nukleotide erfolgt, wurden diese bis zu 2 mM zum optischen Test bei pH = 8,0 zugegeben. Sowohl PEP und ATP als auch A-5'-MP, A-5'-DP, TPP, NAD(P) und $NAD(P)H_2$ zeigten keinen Effekt.

Die 3'-Phosphate A-3': 5'-MP (5 mM) und A-3'-MP (5 mM) bewirkten eine geringe Hemmung auf Grund ihrer schwachen Analogie zu CoA-SH (s. III. 4. 10. 2. 1). Die Wirkung von intermediären α-Ketosäuren (z. B. Oxalacetat, Pyruvat) ist unter III. 4. 10. 1 beschrieben.

4. 13. Der Einfluß von Metallionen auf die Enzymaktivität

4. 13. 1 Einwertige Metallionen

In Kap. III. 4. 2 war der stabilisierende Einfluß höherer Ionenstärke, insbesondere bei niedrigen Temperaturen, auf die IPM-Synthase gezeigt worden. Da vielfach $(K, H)_3PO_4$-Puffer oder KCl verwendet wurde, sollte der Einfluß von einwertigen Metallionen auf die Enzymaktivität am Beispiel von K^+ untersucht werden.

Der Einfluß von Kaliumionen ist sehr gering. So bewirkte 250 mM KCl bei pH = 7,6 eine geringe Hemmung von etwas über 10 %. Dagegen wurde die Hemmung durch L-Leucin durch 40 mM und 200 mM KCl verringert (Tab. 22). Bei pH 8, 1 zeigten 40 mM und 200 mM KCl eine leicht stimulierende Wirkung (106 - 107 % Aktivität). 400 mM KCl erniedrigten dagegen die Aktivität um ca. 20 %.

Der Einfluß der Kaliumionen kann also weitgehend vernachlässigt werden.

Tab. 22 Der Einfluß von KCl auf die IPM-Synthase-Aktivität in An- und Abwesenheit von L-Leucin

A Zusätze	ohne KCl	mit 250 mM KCl	
	$\Delta E_{232nm} \cdot 10^{-2}$/min	$\Delta E_{232nm} \cdot 10^{-2}$/min	% Aktivität
ohne Zusätze (pH = 7,6)	4,4	3,45	78,5
L-Leucin 5×10^{-6} M	3,1	3,4	110
L-Leucin 1×10^{-4} M	1,6	2,2	137
B **Zusätze**	**$\Delta E_{232nm} \cdot 10^{-2}$/min**	**% Aktivität**	
ohne Zusätze (pH = 8,1)	6,5	100	
40 mM KCl	7	107,5	
200 mM KCl	6,9	106	
400 mM KCl	5,2	80	

A: Die Aktivität wurde im optischen Test bei 232 nm in TRIS/HCl-Puffer, pH = 7,6, mit 0,75 mM KIV und 0,094 mM Ac~SCoA bestimmt. Die Aktivitätsangabe in % mit KCl bezieht sich auf den jeweiligen Ansatz ohne KCl.

B: Die Aktivität wurde im DTNB-Test in TRIS/HCl-Puffer, pH = 8,1 mit 0,75 mM KIV und 0,094 mM Ac~SCoA bestimmt.

Durch die Zugabe der Na^+ enthaltenden Substratlösungen waren im Test ca. 11 mM Na-Ionen vorhanden.

4.13.2 Zweiwertige- und Schwermetallionen

Die Wirkung von Metallionen wurde durch Zusatz zum dialysierten Extrakt im optischen Test (TRIS/HCl-Puffer, pH = 7,5) geprüft. 1 mM CaC

$MgCl_2$, $ZnCl_2$, $CdCl_2$, $FeCl_2$, $NiCl_2$, $Pb(Ac)_2$ zeigten keinen signifikanten Einfluß auf die Enzymaktivität. $MnCl_2$ ergab eine geringe Aktivierung von ca. 15 %.
Bei pH = 8,0 hatten die Metalle bis zu 0,2 mM im optischen Test mit DTNB ebenfalls keine Wirkung, desgleichen waren auch $CrCl_2$, $CoCl_2$ und $FeCl_3$ im fluorimetrischen Test ohne Einfluß auf die Enzymaktivität.

Aus den Ergebnissen ist zu schließen, daß die IPM-Synthase keine Metallionen benötigt, bzw. keine Metallionen so lose gebunden hat, daß sie durch Gelfiltration oder Anreicherungsprozeduren abgetrennt wurden und ersetzt werden konnten.

4.14 Die Wirkung von Metall-komplexierenden Reagenzien

4.14.1 EDTA und EDTA-Metallkomplexe

KOHLHAW et al. (1969) fanden, daß 1 mM EDTA die IPM-Synthase aus S. typhimurium zu 35 % hemmte. Die Hemmung konnte teilweise durch die Zugabe von Mg^{++}, Mn^{++} oder auch durch Dialyse gegen metallfreien Puffer aufgehoben werden. Die Autoren meinten daher, daß keine zweiwertigen Metallionen vom Enzym benötigt werden, insbesondere, da 8-Hydroxychinolin bis zu 30 % aktivierte.

Auch die IPM-Synthase aus H 16 - A 81 wurde durch 1 mM EDTA sowohl bei pH = 7,5 als auch bei pH = 8,2 um ca. 20 % gehemmt. Die Hemmung konnte durch einen Überschuß jedes der unter 4.13.2 getesteten Metallionen aufgehoben werden. Ebenso konnte, wie beim Enzym aus S. typhimurium, durch Dialyse gegen metallfreien Puffer (50 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 7,5) 95 - 98 % der Aktivität zurückerhalten werden. Damit steht der Befund von 4.13.2 im Einklang, daß die IPM-Synthase kein Metall-Protein-Komplex

ist. (*)

Durch die folgenden Untersuchungen sollte geklärt werden, ob es sich bei der Reaktion von EDTA um Wechselwirkungen mit apolaren Seitenketten des Proteins handelt (CSOPAK et al., 1972; VALLEE und WACKER, 1970), oder ob die IPM-Synthase ein Metall-Protein ist, bei dem das Metallion so fest gebunden ist, daß es durch EDTA nicht entfernt werden kann ("metallo-protein"); EDTA könnte dann durch die Bindung am Metallion Proteindeformationen bewirken und so die Aktivität erniedrigen. Nach VALLEE und WACKER (1970) ist es ein wichtiger Hinweis auf das Vorhandensein von Metallionen, wenn die pH-abhängige Inaktivierung durch EDTA bzw. durch andere Chelatbildner verstärkt wird.
Dies konnte bei der IPM-Synthase aus H 16 - A 81 gezeigt werden (Abb. 58). Dazu war das Enzym in konzentrierter Lösung mit 1 mM EDTA bei dem angegebenen pH-Wert inkubiert und nach der angegebenen Zeit im Test eingesetzt worden. Die EDTA-Konzentration betrug im optischen Test nur noch 0,04 mM; diese Konzentration hatte ohne Vorinkubation keinen Effekt.
Die IPM-Synthase hatte bei pH = 6,2 nach 15 min noch 90 % Aktivität, in Gegenwart von 1 mM EDTA nach 1 min nur noch 30 %. Die Wirkung von EDTA war im sauren Bereich (pH = 6,2) bedeutend stärker als in schwach alkalischen (pH = 8,5).

Ein weiterer Hinweis auf die Anwesenheit eines Metallions im Protein ergab sich durch die Inkubation mit EDTA-Metall-(1:1)-Komplexen (Tab. 23). So

---

(*) Die Komplexe von Metallen und Proteinen sind auf Grund der apparenten Stabilitätskonstanten der Assoziationen eingeteilt worden in "metalloproteins" und "metall-protein-complexes" (VALLEE, 1955; MALMSTRÖM und ROSENBERG, 1959). Bei "metallo-proteins" ist das Metallion so fest gebunden, daß es bei der Anreicherung nicht verloren geht, das hochangereicherte Enzym muß stöchiometrische Mengen an Metallionen aufweisen. Dagegen liegt bei "metallo-protein-complex"-Verbindungen ein echtes Gleichgewicht zwischen gebundenen und nicht gebundenen Metallionen vor.

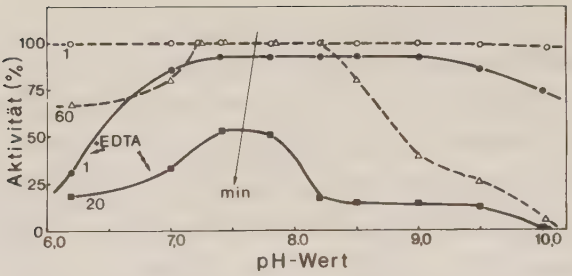


Abb. 58 Die pH-abhängige Inaktivierung der IPM-Synthase in An- und Abwesenheit von EDTA

Die konzentrierte Enzymlösung wurde mit 1 mM EDTA bei den angegebenen pH-Werten und bei 25° C in 250 mM TRIS/HCl-Puffer inkubiert. Aliquots wurden nach 1 min (ohne EDTA) ---o---; ---△--- 60 min (ohne EDTA); —●— 1 min (mit EDTA); —■— 20 min (mit EDTA) entnommen und für die Aktivitätsbestimmung im optischen Test mit DTNB (TRIS/HCl-Puffer, pH = 8,1 30° C) verwendet. Die EDTA-Konzentration im Test betrug nur noch 0,04 mM. Ac~SCoA = 0,47 mM; KIV = 1,5 mM.

bewirkten die schwachen Metall-EDTA-Komplexe eine Inaktivierung, die stärkeren dagegen nicht. Erstaunlich war die Wirkung des Hg-EDTA-Komplexes, der einer der stärksten EDTA-Komplexe ist (Stabilitätskonstante log K_1 = 22,1). Die Inaktivierung durch den Hg-EDTA-Komplex (Mercuribenzoat allein hemmte im optischen Test nicht) ließe sich mit der Vermutung erklären, daß im katalytischen Zentrum eine Metall-S-Proteinverbindung vorliegt, die durch die gemeinsame Wirkung von EDTA und Hg-Ionen unter Bildung von EDTA-Metall-Protein- und Hg-S-Protein-Bindungen aufgebrochen wird. Ein Beweis durch eine SH-Titration in Gegenwart von EDTA steht noch aus.

Auf Grund der pH-abhängigen Inaktivierung der IPM-Synthase durch EDTA und der unterschiedlichen Wirkung der 1:1-Komplexe von Metall und EDTA kann man annehmen, daß die Wirkung von EDTA nicht auf apolaren Wechselwirkungen mit Protein-Seitenketten beruht, sondern daß es sich bei der IPM-Synthase um ein Metall-Enzym ("metallo-protein") handelt.

Tab. 23 Die Wirkung von EDTA-Metall-Komplexen auf die Stabilität der IPM-Synthase bei pH = 6,2

Metallion des (1 mM) EDTA/Metallkomplexes (1:[Me])	Aktivität nach einer Inkubationszeit von 1 min		15 min		45 min	
	$\frac{\Delta E_{412nm}}{min}$	%	$\frac{\Delta E_{412nm}}{min}$	%	$\frac{\Delta E_{412nm}}{min}$	%
	$\times 10^{-2}$		$\times 10^{-2}$		$\times 10^{-2}$	
Kontrolle	8,5	100	7,5	100	7,0	100
Zn^{++} (1:1)	7,5	88,5	7,0	93,5	7,0	100
Fe^{++} (1:1)	7,5	88,5	7,0	93,5	6,5	93
Co^{++} (1:1)	–		7,5	100	7,0	100
Hg^{++} (1:1)	8,8	103	2,5	33,3	1,5	21,2
Mg^{++} (1:1)	7,0	82,5	4	53,5	3	43
Mg^{++} (1:2)	7,0	82,5	5	67	3,2	46
Mg^{++} (1:5)	7,5	88,5	6	80	4,0	57
Kontrolle	13	100	12,5	100	11,5	100
Ca^{++} (1:1)	10	77	6	48	3	24
Ba^{++} (1:1)	10	77	2,5	20	1,8	14,5

Es wurden exakte 100 mM Lösungen von EDTA und Metallsalzen hergestellt und im angegebenen Verhältnis gemischt. Die Mischung wurde zu einer konzentrierten Proteinlösung zugegeben, so daß die Proteinlösung 1 mM EDTA-Metall-Komplex enthielt. Die Aktivität wurde mit einem Aliquot von 9 μl im optischen Test mit DTNB (250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 8,1 bei 30° C KIV = 1,5 mM, Ac~SCoA = 0,47 mM) bestimmt. Die EDTA-Metall-Komplex-Konzentration im optischen Test betrug 0,009 mM.

4.14.2 Die Inaktivierung durch EDTA in Gegenwart der Substrate und Effektoren

Um die Wirkung von EDTA in Gegenwart der Effektoren bei verschiedenen pH-Werten beurteilen zu können, wurde als Kontrolle der Einfluß von L-Leucin, L-Valin und KIV mitbestimmt. In Abb. 59 ist die pH-abhängige Inaktivierung ohne EDTA durch die offenen Symbole und die gestrichelten Kurven,

die in Gegenwart von EDTA durch die geschlossenen Symbole und durchgezogenen Kurven wiedergegeben.

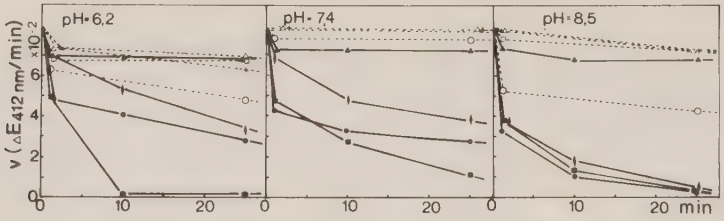


Abb. 59 Die Inaktivierung durch EDTA in Gegenwart von L-Leucin, L-Valin und KIV bei verschiedenen pH-Werten

Die konzentrierte Enzymlösung wurde mit den angegebenen Zusätzen bei 25° C inkubiert. Aliquots wurden nach 1, 10 und 25 min entnommen und für die Aktivitätsbestimmung im optischen Test mit DTNB verwendet (TRIS/HCl-Puffer, pH = 8,2; KIV = 1,5 mM, Ac~SCoA = 0,47 mM, 30° C).
Die offenen Symbole und die gestrichelten Kurven zeigen die Werte ohne EDTA, die geschlossenen Symbole und die durchgezogenen Kurven die Werte mit 1 mM EDTA.
--+--◆-- ohne Zusätze, --△-- , —▲— 2 mM KIV, --○--, —●— 1 mM L-Leucin, --□--, —■— 10 mM L-Valin.
100 % Aktivität entsprechen einem $\Delta E_{412nm/min} = 8,6 \cdot 10^{-2}$, d.h. einer Bildung von 7,8 µmole CoA-SH/min.

L-Leucin verstärkt die Inaktivierung, die durch die Wasserstoffionenkonzentration bei pH = 6,2 und 8,5 erfolgt, während L-Valin kaum eine Wirkung hat. In Gegenwart von EDTA bewirken beide Aminosäuren eine schnellere Aktivitätsabnahme im Vergleich zur Wirkung von EDTA allein. Überraschend ist die gegenüber L-Leucin größere Wirksamkeit von L-Valin bei pH = 6,2. Bei pH = 7,5 und noch mehr bei pH = 8,5 ist die Aktivitätsabnahme durch EDTA stärker als bei pH = 6,2, so daß die Wirkung von L-Leucin und L-Valin nicht mehr so auffällig ist.
Das Substrat KIV stabilisiert bei allen pH-Werten das Enzym weitgehend gegen die Inaktivierung durch EDTA. Auch in Gegenwart von 2 mM L-Leucin und 10 mM L-Valin konnte durch die Zugabe von KIV die Inaktivierung

der IPM-Synthase stark verringert werden.

Das Substrat Ac~SCoA konnte nur bei pH = 6,2 eingesetzt werden, da bei höheren pH-Werten das durch Hydrolyse entstehende CoA-SH das Enzym verstärkt inaktivierte. Die Zugabe von 2 mM Ac~SCoA konnte über 20 min die volle Aktivität des Enzyms erhalten; nach 45 min war aber nur noch 53 % der Aktivität vorhanden. Obwohl der pH-Wert 6,2 betrug, war nach 45 min eine größere Menge freies CoA-SH nachzuweisen, so daß die Inaktivierung, jedenfalls teilweise, auf die Wirkung von CoA-SH zurückgeführt werden muß (s. III.4. 8. 2). Inwieweit bei der unspezifischen Spaltung von Ac~SCoA durch die IPM-Synthäse die Wirkung von EDTA auf das Enzym eine Rolle spielte, oder ob nur die hohe Ac~SCoA-Konzentration dafür verantwortlich war, war nicht weiter untersucht worden.

Aus diesen Ergebnissen kann für ein Metalloenzym folgendes vermutet werden:

1. Das Metallion sitzt im katalytischen Zentrum, so daß es durch die Bindung der Substrate vor dem EDTA-Angriff geschützt wird und
2. Die Effektoren L-Leucin und L-Valin bewirken eine Strukturänderung des Proteins, die eine Begünstigung des EDTA-Angriffs zur Folge hat. Die Annahme, daß L-Leucin und L-Valin allosterische Effektoren sind, wird damit bestätigt.

4. 14. 3 Die Wirkung verschiedener Metall-Protein-Inhibitoren

Um das Metall im Protein weiter zu charakterisieren, wurden verschiedene Komplexbildner eingesetzt.

Das unlösliche, in Perlform vorliegende Chelating Resin A1 war, wahrscheinlich auf Grund sterischer Hinderung, zwischen pH = 6,2 und pH = 9,0 sowohl bei 28° C als auch bei 40° C wirkungslos, obwohl es eine äußerst hohe Affinität für Schwermetallionen hat (z.B. Fe^{2+} unterhalb von 10^{-9} M). Dieser Befund deutet darauf hin, daß sich das Metallion mehr im Proteininneren befindet. Ebenfalls ohne Wirkung auf die Enzymstabilität war

Magneson (p-Nitrobenzolazo-α-Naphtol). Dagegen bewirkte 1 mM Titangelb bei pH = 6,2 und pH = 8,5, nicht aber bei pH = 7,5 eine verstärkte Inaktivierung, welche aber durch eine Verdünnung und durch die Zugabe der Substrate (schon im Testansatz) aufhebbar war; nach 2 - 3 min trat im Test eine deutliche Reaktivierung auf. α,α'-Bipyridyl und 8-Hydroxy-chinolin-5-sulfonsäure hatten bis zu 2 mM bei pH = 6,2 und pH = 8,5 keinen Einfluß auf die Enzymstabilität, dagegen inaktivierte 10 mM α,α'-Bipyridyl bei pH = 8,5 innerhalb von 20 min auf nahezu 20 % Restaktivität; eine Reaktivierung durch die Zugabe von KIV war nicht festzustellen.
Nach WARBURG (1949) sind die klassischen Metall-Protein-Inhibitoren S^{--} (0,1 mM), CN^{-} (0,1 mM), N_3^{-} (100 mM) und CO für Eisen, Kupfer und Zink enthaltende Proteine besonders gut geeignet. Sie wurden in den angegebenen Konzentrationen zum Test zugegeben. CO wurde durch die Proteinprobe bis zu 5 min durchgeleitet; ebenso wurde der Testansatz 5 min lang mit CO begast. Doch alle Inhibitoren waren ohne Wirkung auf die IPM-Synthase-Aktivität. Damit ist es unwahrscheinlich, daß die IPM-Synthase Fe^{++}, Cu^{++} oder Zn^{++} als Metallion enthält.

4.14.4 Versuche zur Reaktivierung

Eine spezifische Reaktivierung durch bestimmte Metallionen gelang nicht.

Das durch 1 mM EDTA und 10 mM α,α'-Bipyridyl inaktivierte Enzym wurde, sofern es bei pH = 8,5 inkubiert worden war, innerhalb von 60 h überhaupt nicht, auch nicht in Gegenwart von 1 mM KIV, 1 mM Mercaptoäthanol und bei Temperaturen zwischen 28° C und 40° C reaktiviert. War das Enzym dagegen bei pH = 6,2 mit EDTA inkubiert worden, so wurde es durch fast alle eingesetzten Metallionen reaktiviert (Tab. 24).
Da eine spezifische Reaktivierung mit Hilfe eines oder zweier Metallionen nicht gefunden wurde, kann die Identifizierung des im Protein enthaltenen Metallion nur durch spektroskopische Methoden erfolgen und bleibt daher

Tab. 24 Reaktivierung der durch EDTA bei pH = 6,2 inaktivierten IPM-Synthase durch Metallionen

Zusatz (1 mM)	Aktivität nach 24 h Inkubationszeit	
	$\Delta E_{412nm} \cdot 10^{-2}$/min	%
Kontrolle ohne EDTA in $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 7,5	9,5	100
Kontrolle ohne Metall in $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 7,5	8	84
Zn^{++}	7	74
Fe^{++}	9	95
Mg^{++}	9,5	100
Co^{++}	6	63
Ni^{++}	8,5	90
Ca^{++}	9,5	100
Cd^{++}	9,5	100
Dialyse gegen $(K,H)_3PO_4$-Puffer		
pH = 8,2	8,5	90
pH = 7,5	8,3	87,5

Die Inkubation von 2 h mit 5 mM EDTA erfolgte in $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 6,2 bei 39° C. Zur Bestimmung der Aktivität wurde ein Aliquot in 250 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH =7,5 mit angegebenem Zusatz (1 mM) gegeben und nach 24 h im DTNB-Test mit 250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH = 8,1 bei 30° C getestet; KIV = 1,5 mM, Ac~SCoA = 0,47 mM.

späteren Untersuchungen vorbehalten.

4.15 Der Einfluß von L-Leucin und L-Valin auf das Temperaturoptimum der Reaktionsgeschwindigkeit und auf die Aktivierungsenergie E_A^{br} der IPM-Synthase-Reaktion

4.15.1 Der Einfluß auf das Temperaturoptimum

Das Temperaturoptimum für die Reaktionsgeschwindigkeit wurde in Gegenwart von 2 mM L-Valin von 44° C auf 46° C und in Gegenwart von 0,1 mM L-Leucin auf 48° C erhöht (Abb. 60).

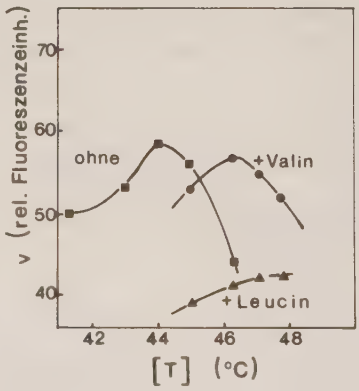


Abb. 60 Temperaturoptimum in Gegenwart von Effektoren

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im fluorimetrischen Test (s. Methoden) mit 250 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 7,5, bei 25° C. Der Ansatz wurde mit über Sephadex G 25 gereinigtem Rohextrakt (1,1 mg) von H 16 - A 81 gestartet. Zur Stabilisierung des Enzyms war während der Herstellung des zellfreien Extraktes 0,1 mM KIV zugesetzt worden. Die Temperatur wurde wie angegeben variiert. —■— ohne Zusätze, —●— + 2 mM L-Valin, —▲— + 0,1 mM L-Leucin.

4.15.2 Der Einfluß auf die Aktivierungsenergie

Es sollte geprüft werden, wie stark der Inhibitor auf das katalytische Zentrum wirkt und die Aktivierungsenergie verändert. Durch die Anwesenheit von 0,05 mM L-Leucin erhöhte sich die Aktivierungsenergie E_A^{br} von ca. 11 kcal/mol auf 20 kcal/mol für den Temperaturbereich von 28 - 30° C, und auf 17,5 kcal/mol, wenn über den gesamten Temperaturbereich gemittelt wurde (Abb. 61).

Wurde die durch L-Leucin verursachte Hemmung mit L-Valin aufgehoben,

so wurde für den Temperaturbereich von 20 - 28° C die ursprüngliche Aktivierungsenergie von 11 kcal/mol erhalten. Überraschend war aber der Einfluß der Aminosäuren auf den Gesamtkurvenverlauf in der Arrhenius-Auftragung (III. 4. 15. 3).

4. 15. 3 Der Einfluß der Aminosäuren auf die Temperaturanomalie

Bei der Bestimmung des Temperaturoptimums und der Aktivierungsenergie war aufgefallen, daß in der Arrhenius-Auftragung keine Geraden über den Temperaturbereich von 25° C bis ca. 40° C erhalten wurden. Insbesondere bei pH = 7,5 waren stärkere Abweichungen - die außerhalb der normalen Fehlerbreite des Testes lagen - von einem linearen Kurvenverlauf aufgetreten. Bei ca. 35° C knickten die Kurven ab, so daß zur Berechnung von E_A^{br} der Temperaturbereich von 25 - 35° C zugrunde gelegt wurde (vgl. Abb. 12 - 14). Die Abweichungen von einem linearen Verlauf wurden durch die Zugabe des allosterischen Effektors L-Leucin stark verringert; dies erfolgte auch bei zusätzlicher Gegenwart von L-Valin, das die leucinbedingte Hemmung aufhob.

Dagegen wurden durch L-Valin allein die Abweichungen eher noch verstärkt als verringert (Abb. 61). Dieses unterschiedliche Verhalten weist wiederum auf eine prinzipielle antagonistische Wirkungsweise von L-Valin zu L-Leucin hin.

Da die Abweichungen in allen aufgenommenen Testreihen auftraten (vgl. Abb. 12 - 14), sowohl bei der Aktivitätsbestimmung im fluorimetrischen Test (Endpunktbestimmung des Produktes IPM) als auch im optischen Test (Bestimmung der Anfangsaktivität über das Auftreten des Produktes CoA-SH), mit Rohextrakt und mit angereichertem Enzym, in $(K,H)_3PO_4$-Puffer und in TRIS/HCl-Puffer, bei pH = 7,5 und bei pH = 8,1 also unter den verschiedensten Testbedingungen, kann man davon ausgehen, daß es sich nicht um Meßfehler, sondern um echte "Temperaturanomalien" (TALSKY, 1971) handelte.

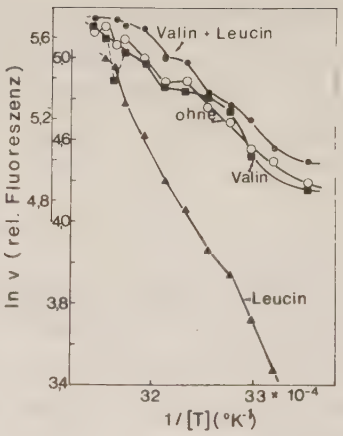


Abb. 61 Temperaturabhängigkeit der IPM-Synthase in Gegenwart von L-Leucin und L-Valin (Arrhenius-Auftragung)

Die Aktivität wurde im fluorimetrischen Test bestimmt (s. Methoden), mit 250 mM $(K,H)_3PO_4$-Puffer, pH = 7,5. Die Temperatur wurde wie angegeben variiert. Der Test wurde mit gereinigtem Enzym (7,5 E/mg Protein) gestartet.—o— ohne Zusätze, —■—+ 2 mM L-Valin,—▲—+ 0,05 mM L-Leucin,—●—+ 0,05 mM L-Leucin und 2 mM L-Valin.

Nach TALSKY (1971) und in Verbindung mit den aufgezeigten Substrat-induzierten Konformationsänderungen (III.4.7) lassen sich diese Anomalien durch temperaturbedingte Konformationsänderungen erklären. Das veränderte Verhalten des Enzyms in Gegenwart von L-Leucin bestätigt dabei noch einmal die Annahme, daß L-Leucin ein allosterischer Effektor ist.
Um festzustellen, ob es sich um reversible oder um irreversible Vorgänge handelte, wurde eine Enzymprobe für 20 min bei 40° C inkubiert, wobei zur Stabilisierung der Aktivität 20 mM KIV zugesetzt wurde. Für einen nach der Inkubation getesteten Bereich von 30 - 40° C ergab sich das gleiche Anomalieverhalten wie vorher. Damit werden irreversible Strukturänderungen unwahrscheinlich.

Auch die Gegenwart von 500 mM KCl verhinderte nicht das anomale Temperaturverhalten (Abb. 62).

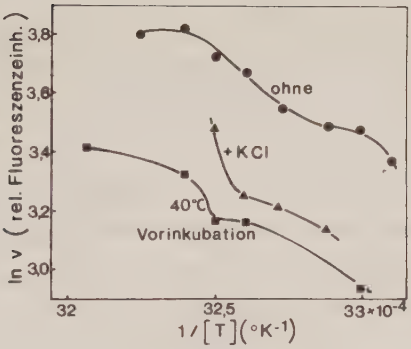


Abb. 62 Temperaturanomalie in Gegenwart von 500 mM KCl und nach Inkubation bei 40° C

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte wie unter Abb. 60 angegeben. —●— ohne Zusätze, —■— nach Vorinkubation bei 40° C für 20 min —▲— + 500 mM KCl.

IV. DISKUSSION

Viele Biosyntheseenzyme liegen in der Zelle unter normalen Anzuchtsbedingungen in relativ niedrigen Konzentrationen vor, so daß sich die Enzyme in einem Rohextrakt zwar nachweisen lassen, kinetische Messungen aber kaum möglich sind.
Auch die IPM-Synthase-Aktivität ist in heterotroph gewachsenen Zellen und erst recht in autotroph gewachsenen Zellen von H. eutropha H 16 verhältnismäßig niedrig. HILL (1968) bestimmte im fluorimetrischen Test bei pH = 7,5 eine spezifische Aktivität von 3,27 E/g Protein. Dagegen wurde durch Messung im pH-Optimum (pH = 8,2) nach heterotropher Anzucht ein Wert von 10 E/g Protein bzw. nach autotropher Anzucht ein Wert von 6,5 E/g Protein gefunden.
Ähnlich geringe spezifische Aktivitäten für die IPM-Synthase wurden auch in anderen Organismen bestimmt:
9,25 E/g Protein in Mais-Keimen (OAKS, 1965), 15 E/g Protein in Saccharomyces spec. (ULM et al., 1972), 12,5 E/g Protein in M. denitrificans (bei 37° C bestimmt, FISCHER, 1973), jeweils im oder in der Nähe des pH-Optimums gemessen.

Zur Charakterisierung solcher Enzyme ist eine Anreicherung durch Abtrennung von anderen Proteinen unerläßlich. Dabei ist es günstig, insbesondere bei allosterischen Enzymen, die bei der Anreicherung ihre Eigenschaften leicht verlieren oder verändern können, wenn man mit möglichst wenigen biochemischen Anreicherungsschritten auskommt. Diesem Ziel kann man durch eine biologische Anreicherung auf Grund genetischer Manipulationen oder durch besondere Anzuchtsbedingungen näherkommen (verschiedene Methoden siehe DEMAIN, 1971). Eine sehr elegante Möglichkeit ist die Verwendung von Mutanten mit konstitutiv dereprimierter Bildung des gewünschten Enzyms. So erreichten CALVO und CALVO (1967) eine 10-fache Anreicherung der Leucinbiosynthese-Enzyme in N. crassa. GILBERT und MÜLLER-HILL (1966) verwendeten zur Anreicherung des Lac-Repressors

Mutanten mit vervielfachten Genabschnitten und einer zusätzlich dereprimierten Synthese des Enzyms.

Die Darstellung solcher Mutanten erfordert jedoch meist einen hohen Arbeitsaufwand. Leichter und auch von genetisch wenig charakterisierten Organismen sind auxotrophe Mutanten zu erhalten, die, wenn sie unter ständig wachstumsbegrenzender Konzentration des essentiellen Produkts (Derepressionsbedingungen) angezogen werden, ebenfalls stark erhöhte Konzentrationen der intakten Enzyme des betreffenden Biosyntheseweges aufweisen.

Hier, wie auch bei den anderen Mutanten, muß sichergestellt sein, daß das zu untersuchende Enzym von der Mutation nicht betroffen wird. Die in dieser Arbeit verwendete L-Valin und L-Isoleucin doppelauxotrophe Mutante H. eutropha H 16 - A 81 (REH, 1967) erfüllt diese Voraussetzungen insofern, als sie vor der Verzweigung der L-Valin-L-Leucin-Biosynthesekette blockiert ist. Das Protein der IPM-Synthase ist unverändert. Dies bestätigt ein Vergleich der Hemmung des Enzyms durch L-Leucin und die Aufhebung der Hemmung durch L-Valin in Rohextrakten des unter verschiedenen Bedingungen angezogenen Wildtyps mit den entsprechenden Eigenschaften des angereicherten Enzyms der Mutante.

Die in H 16 - A 81 durch Derepression erreichten Enzymaktivitäten von 100 - 334 E/g Protein sind ähnlich hoch wie die, die andere Autoren in den zur Anreicherung der IPM-Synthase verwendeten Mutanten erhalten haben: 180 E/g Protein in S. typhimurium CV - 19 (KOHLHAW et al., 1969), 90 E/g Protein in N. crassa D 3: 23 A (WEBSTER und GROSS, 1965). Auch die spezifischen Aktivitäten der gereinigten Enzyme sind annähernd gleich groß. So erhielten KOHLHAW et al. (1969) sowie WEBSTER und GROSS (1965) für das Enzym aus Salmonella bzw. aus Neurospora 14 500 E/g Protein, für Hydrogenomonas wurden 12 000 E/g Protein bestimmt.

Unter der Voraussetzung, daß der erhaltene Rohextrakt repräsentativ für die lösliche Proteinfraktion in der Zelle ist und daß die erhaltene Aktivität für das reine, aktive Enzym gilt, errechnet sich für H 16 - A 81 für den

maximal gemessenen Wert von 334 E/g Protein ein Gehalt von 2,8 % an IPM-Synthase-Protein in der löslichen Fraktion; für autotroph angezogene Wildtypzellen ergab sich ein Wert von 0,05 %, für heterotroph angezogene Zellen ein Wert um 0,1 %. Für die Mutante CV - 19 von S. typhimurium ergab sich ein Wert von 1,25 % (KOHLHAW et al., 1969).
Diese Werte zeigen, daß Hydrogenomonas sehr gut in der Lage ist, seine Enzymsynthese den Wachstumsbedingungen anzupassen und sie auch erheblich zu steigern. An anderen Organismen ist gezeigt worden, daß man die Synthese einzelner Enzyme noch stärker erzwingen kann. So erhöhten GAREN und OTSUJY (1964) den Gehalt an alkalischer Phosphatase in E. coli auf 5 % (Ausgangswert ~0 %), TAYLOR und TROTTER (1967) den an ATCase in E. coli auf 10 % des Zellproteins und HARTLEY (1973) den an Ribitol-Dehydrogenase in Klebsiella aerogenes sogar auf 25 % (Ausgangswert ~1 %) der löslichen Proteinfraktion.

Im allgemeinen befinden sich die Biosyntheseenzyme der Aminosäuren im Cytoplasma der Zellen (d.h. in der löslichen Fraktion von Zellaufschlüssen). So wurde die IPM-Synthase in M. denitrificans (FISCHER, 1973), Arthrobacter St. 23 (BAUMGARTEN, 1969), S. carlsbergensis (SAI et al., 1969), Saccharomyces spec. (ULM et al., 1972) auch in der löslichen Proteinfraktion bestimmt.
Jedoch wurde für N. crassa von der Arbeitsgruppe um WAGNER (KIRITANI et al., 1965; COLLINS und WAGNER, 1972) berichtet, daß die Syntheseenzyme für die verzweigten Aminosäuren nur in der Mitochondrienfraktion zu finden sind. WEBSTER und GROSS (1965) isolierten zwar aus diesem Organismus die IPM-Synthase, wobei sie den Rohextrakt mit 8 000 g zentrifugierten, diskutierten aber nicht, ob das Enzym zur löslichen oder zur Partikelfraktion zuzurechnen ist.
Die IPM-Synthase in H. eutropha H 16 - A 81 wurde sowohl im Überstand als auch im Sediment des Zellaufschlusses (Ultra-Schall) nachgewiesen. Doch konnte auf Grund der Verteilung der Aktivität zwischen Sediment und

Überstand nach dem Aufschluß der Zellen mit der Frenchpresse sowie nach mehrmaligem Resuspendieren der Zelltrümmer wahrscheinlich gemacht werden, daß die IPM-Synthase nicht partikelgebunden ist, sondern daß die Aktivität im Niederschlag auf einer Adsorption des Enzyms während des Aufschlusses beruht; durch Untersuchungen am gereinigten Enzym (Protaminsulfatfällung, Isoelektrischer Punkt, Reaktion mit Cytochrom c) ließ sich zeigen, daß vorhandene saure Seitenketten im Protein für eine Adsorption an basische Gruppierungen verantwortlich gemacht werden können.
Es läßt sich schwer beurteilen, wieweit dieser Adsorptionseigenschaft des Enzyms eine physiologische Bedeutung zukommt. Die Vorstellung von SCHLEIDEN und SCHWANN (1835) von der Zelle als einem undifferenzierten Tropfen von Cytoplasma in einer Zellmembran sind heute überholt. Man weiß, daß neben einer Ordnung durch Membranen und Proteine, die an und in den Membranen fest gebunden sind, auch im Cytoplasma eine gewisse Ordnung und Abgrenzung vorhanden sein muß und daß die "löslichen Enzyme" nicht regellos in der Zelle verteilt sein können. Man kann annehmen, daß durch die Wechselwirkungen von Proteinen untereinander sowie mit cytoplasmatischen Membranen und Strukturen eine räumliche Ordnung aufgebaut wird und so die Proteine z.T. in Funktionseinheiten und in quasi voneinander getrennten Raumbezirken mit unterschiedlichen pH-Werten und Konzentrationen an Intermediaten vorhanden sein können (LYNEN, 1972). Eine solche Ordnung aufbauende oder stabilisierende Wirkung könnte der gefundenen Adsorptionseigenschaft der IPM-Synthase in H 16 - A 81 möglicherweise zukommen.
Zerstört man diese Ordnung durch Aufbrechen der Zellen, so muß man immer mit Artefaktreaktionen rechnen. Besonders bei jeder Reinigung von Enzymen stellt sich die Frage, inwieweit ein Enzym durch das Herausreißen aus dem natürlichen Zellmilieu und durch die Proteinfraktionierungsmethoden verändert wird. Andererseits ist eine Isolierung des zu untersuchenden Enzyms meist unerläßlich, um den Interpretationsspielraum kinetischer Messungen einschränken zu können, wie an den Untersuchungen zur Substrat-

spezifität und bei der Deutung der Substratsättigungskurven zu sehen ist.

Schon im Rohextrakt kann die Einwirkung von freigesetzten Proteasen zu einer Änderung des Proteins und damit der Enzymeigenschaften führen. Um eine Beeinflussung und eine Aktivitätsminderung der IPM-Synthase auf ein Minimum zu reduzieren, wurde der Zellsuspension noch vor dem Aufbrechen der Zellen Kaliumfluorid zugesetzt, das vor allem Serin Proteasen hemmt, und der Extrakt wurde bis zur Abtrennung der Peptidasen zwischen 0° C und 6° C gehalten. Zur Verringerung der Einwirkungszeit der Proteasen wurde die Aufschlußzeit durch Zusatz von Al_2O_3 zur Zellsuspension verkürzt, der Rohextrakt nur 20 - 30 min zentrifugiert und die erste Ammoniumsulfatfraktionierung sehr rasch durchgeführt. Die starke Inaktivierung beim Ultraschall-Aufschluß durch kurzzeitig erhöhte Temperaturen über 10° C muß aber noch andere Gründe als die Proteasenaktivität im Extrakt haben. Es ist zu vermuten, daß bei diesen Temperaturen eine Proteinkonformation vorliegt, die durch Ultraschallwellen zerstört wird, wobei die Enzymaktivität verloren geht.

ULM et al. (1972) setzten dem Rohextrakt von Saccharomyces spec. Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) zu, welches ebenfalls Proteasen hemmt, die Serin im Reaktionszentrum enthalten. PMSF hatte aber in Extrakten aus H 16 - A 81 keine stärkere Wirkung als Kaliumfluorid.

Weiterhin wurden, um Strukturänderungen zu vermeiden, drastische Methoden wie Säure-, Hitze- und organische Detergenzfällungen zur Proteinfraktionierung vermieden. Die gleiche Abhängigkeit der Enzymaktivität im Rohextrakt und in den gereinigten Enzymlösungen vom pH-Wert, von der Temperatur (d.h. gleiche E_A^{br}-Werte und das Auftreten der Temperaturanomalien) und die gleiche Hemmbarkeit durch L-Leucin lassen es unwahrscheinlich erscheinen, daß es während der Enzymreinigung zu einer Änderung des Proteins durch proteolytische Enzyme gekommen ist.

Die Schwierigkeiten bei der Reinigung dieser IPM-Synthase lagen vor allem in der Instabilität des Enzyms, die zum Teil auf die durch die Proteasen-

aktivität verdeckte und daher nicht sofort erkennbare Kältelabilität des Enzyms zurückzuführen ist. Für keine der bisher beschriebenen IPM-Synthasen wurde ein negativer Einfluß von Temperaturen unter 10° C auf die Enzymaktivität gefunden. Die Kältelabilität konnte auf eine Verringerung der apolaren Wechselwirkungen oder / und auf eine Zunahme der polaren Bindungen zwischen den Seitenketten im Protein bei einer Erniedrigung der Temperatur zurückgeführt werden.

Die Adsorptionseigenschaft der IPM-Synthase in Verbindung mit dem Isoelektrischen Punkt von pH = 3,9 - 4,0 und die Kältelabilität stehen im Einklang mit der Vorstellung, daß bei vielen Proteinen die polaren Aminosäurereste bei der Faltung in die Tertiärstruktur hauptsächlich peripher und die apolaren mehr im Innern des Proteins zu liegen kommen. Sind die Wechselwirkungen zwischen den apolaren Aminosäuren in erster Linie für die Erhaltung der aktiven Struktur des Proteins verantwortlich, so kommt es in polaren Lösungsmitteln wie Wasser zu einer Kälteempfindlichkeit; sie liegt auch dann vor, wenn durch eine temperaturbedingte Zunahme polarer Wechselwirkungen zwischen Proteinketten die Enzymstruktur drastisch verändert wird.

Beide Vorgänge, die Abnahme der Festigkeit von apolaren Bindungen und die Zunahme der Stärke von polaren Bindungen zwischen den Seitenketten, werden durch die Änderung von Temperatur oder Ionenstärke in gleicher Weise beeinflußt; daher ist auf Grund der vorgelegten Versuche nicht eindeutig zu unterscheiden, welcher Effekt für die Kältelabilität der IPM-Synthase die entscheidende Rolle spielt.

Höhere KCl-Konzentrationen verstärken zwar die Enzymstabilität, erniedrigen aber auch die Umsatzrate. Im Gegensatz zu der IPM-Synthase aus H 16 - A 81 benötigen die pilzlichen Enzyme (ULM, 1972; WEBSTER und GROSS, 1965) zur maximalen Aktivität einwertige Metallionen, wobei K^{+} die größte Wirkung hat. KOHLHAW et al. (1969) setzten bei der Aktivitätsbestimmung des Enzyms aus S. typhimurium stets 200 mM NaCl zu, ohne daß dieser Schritt begründet wurde.

Weitere Schwierigkeiten bei der Anreicherung und Charakterisierung des Enzyms lagen in der geringen Ausbeute der einzelnen Schritte, besonders der Adsorptionschromatographie und der präparativen Gelelektrophorese, sowie in der Empfindlichkeit des angereicherten Enzyms beim Einengen mit Diaflomembranen und Ammoniumsulfat. Dies deutet auf eine nicht sehr kompakte Enzymstruktur hin, die leicht zu verändern ist.

Ein Vergleich der strukturellen und katalytischen Eigenschaften zwischen den angereicherten IPM-Synthasen aus Neurospora, Saccharomyces und Salmonella läßt sowohl weitgehende Ähnlichkeiten als auch grundsätzliche Unterschiede erkennen.
Für die IPM-Synthase aus H 16 - A 81 wurde das bisher geringste Molekulargewicht von ~115 000 bestimmt, für das Enzym aus Saccharomyces spec. 137 000 (ULM et al., 1972), aus N. crassa 143 000 (WEBSTER und GROSS, 1965) und aus S. typhimurium 200 000 (KOHLHAW und BOATMAN, 1971). In Gegenwart von L-Leucin wurde für das Enzym aus H 16 - A 81 und aus Saccharomyces spec. ein um 15 000 bzw. 18 000 geringeres Molekulargewicht gefunden, während für das Enzym aus N. crassa eine geringfügige Erhöhung der Sedimentationskonstante $S_{20,\omega}$ (das entspricht einer Erhöhung des Molekulargewichtes) erhalten wurde. Im Gegensatz zu diesen geringen Änderungen bewirkte L-Leucin bei dem Enzym aus S. typhimurium (KOHLHAW et al., 1969) eine drastische Erniedrigung des Molekulargewichtes, so daß dieser Effekt zur Enzymanreicherung ausgenutzt werden konnte.
Für die beiden pilzlichen Enzyme wird eine allosterische Änderung des Proteins, d.h. die Änderung des Stoke'schen Radius angenommen, während für das bakterielle Enzym aus S. typhimurium ein Assoziations-Dissoziations-Gleichgewicht in 4 Untereinheiten bewiesen wurde, das sowohl von der L-Leucin- als auch von der Proteinkonzentration abhängig ist. Für das Enzym aus M. denitrificans kann auf Grund der verzögerten Elution von der Sephadex G 200 Säule in Gegenwart von L-Leucin gegenüber der Elution ohne Effektor ein ähnliches Phänomen erwartet werden. Dagegen ist für die hier

untersuchte IPM-Synthase aus H 16 - A 81 ein solcher Mechanismus so gut wie auszuschließen; wie bei den nicht bakteriellen Enzymen ist nur mit einer allosterischen Änderung der Proteinstruktur zu rechnen. Eine L-Leucin-abhängige Dissoziation in Untereinheiten wird neben der nur geringen Verschiebung durch den Zusatz von L-Leucin bei der Elution von der Sephadex G 150 und G 200 Säule auch durch die gleiche Verteilung der Proteinbanden in An- und Abwesenheit von L-Leucin bei der Gelelektrophorese ausgeschlossen.

Damit ist gezeigt, daß der bei S. typhimurium vorliegende Mechanismus für die Hemmung der IPM-Synthase-Aktivität durch L-Leucin auch für die bakteriellen Enzyme nicht als eine allgemein anzunehmende Wirkungsweise anzusehen ist. Durch Untersuchungen an weiteren Organismen muß geprüft werden, wie weit der Hemmtypus aus S. typhimurium verbreitet ist.

Weitere Hinweise auf eine allosterische Strukturänderung des Enzyms aus H 16 - A 81 durch die Bindung von L-Leucin sind die verstärkte Inaktivierung durch EDTA und CoA-SH, die Erhöhung des Temperaturoptimums von 44° C auf 48° C und der Aktivierungsenergie von ca. 11 kcal/Mol auf 20 kcal/Mol, die starke Verringerung der Temperaturanomalie, der Wechsel von einer positiven Kooperativität für geringe und hohe Substrat(KIV)-Sättigungskonzentrationen in eine negative Kooperativität sowie die in der Dixon-Auftragung sichtbaren homotropen Effekte des L-Leucin.

Die Hemmung der Enzymaktivität durch L-Leucin weist bei allen Enzymen trotz der bewirkten unterschiedlichen Konformationsänderungen einige Ähnlichkeiten auf. Sowohl bei dem Enzym aus Salmonella (KOHLHAW et al., 1969) und dem aus Micrococcus (FISCHER, 1973) als auch bei dem aus H 16 - A 81 wird die Hemmung durch steigende Konzentration des Substrats Ac~SCoA teilweise aufgehoben. Gegenüber dem Substrat KIV entspricht die Hemmung durch L-Leucin einem nicht-kompetitiven Hemmtypus; beim Enzym aus Neurospora (WEBSTER und GROSS, 1965) ist die Hemmung gegenüber Ac~SCoA bei höheren pH-Werten kompetitiv, bei niedrigeren pH-Werten dagegen und gegenüber dem Substrat KIV vom gemischten Typ.

Bei allen Enzymen ist die Enzymaktivität selbst sowie das Ausmaß der Hemmung durch L-Leucin vom pH-Wert abhängig. Die pH-Optima für die Aktivität liegen zwischen pH = 6,8 und pH = 9. Der optimale pH-Bereich ist verhältnismäßig breit und variiert von Organismus zu Organismus. Interessant ist nun, daß bei allen das pH-Optimum für die Hemmung durch L-Leucin signifikant gegenüber dem für die Katalyse zu kleineren pH-Werten verschoben ist. Die Änderung der Empfindlichkeit für L-Leucin erfolgt stets in relativ kleinen pH-Bereichen. Es ist daher möglich, daß jeweils die gleichen Gruppierungen im Protein titriert werden. Die pK_a-Werte für die Hemmung durch L-Leucin betragen ca. 8,2 (H 16 - A 81)

8,0 bzw. 8,3 (Saccharomyces spec., ULM et al., 1972)

7,6 (N. crassa, WEBSTER und GROSS, 1965)

7,1 (M. denitrificans, FISCHER, 1973)

7,0 (S. typhimurium, KOHLHAW et al., 1969).

Auffallend ist, daß die niedrigen pH-Werte um pH = 7 für die bakteriellen Enzyme, welche in Gegenwart von L-Leucin in Untereinheiten zerfallen, bestimmt wurden, während für die Enzyme, bei denen L-Leucin wahrscheinlich nur eine allosterische Konformationsumwandlung bewirkt, Werte um pH = 8 erhalten wurden. Der pK_a-Wert ist aber abhängig von der Umgebung der ionisierbaren Gruppen, so daß durch chemische Methoden geprüft werden muß, ob es sich in den verschiedenen Enzymen um identische Gruppen handelt; in Betracht kämen vor allem die Imidazol-Gruppe im Histidin und die SH-Gruppe des Cystin.

Die unterschiedliche Struktur der IPM-Synthasen zeigt sich auch in dem Gehalt an freien SH-Gruppen. Während das Enzym aus H 16 - A 81 keine freien SH-Gruppen besitzt und nicht durch DTNB gehemmt wird, weist das Enzym aus S. typhimurium 16 (KOHLHAW, 1970) und das aus N. crassa 10 (WEBSTER et al., 1965) titrierbare SH-Gruppen auf. Diese Enzyme sowie auch das aus Saccharomyces spec. werden durch DTNB gehemmt, woraus sich ergibt, daß für die Katalyse essentielle SH-Gruppierungen vorhanden sind; so ist das Enzym aus Salmonella nach der Bindung von 4 - 5 SH-Grup-

pen während der Titration inaktiv.

Genauer untersucht werden muß noch die Wirkung von L-Leucin in An- und Abwesenheit von SDS und EDTA auf die SH-Gruppentitration. Dadurch wäre eine Beurteilung der Annahme möglich, daß im katalytischen Zentrum evtl. eine Metall-S-Protein-Bindung vorhanden ist. Daß in der IPM-Synthase aus H 16 - A 81 ein Metallion fest gebunden ist, konnte durch die Hemmung und Inaktivierung mit EDTA und anderen Metallkomplexbildnern bei verschiedenen pH-Werten wahrscheinlich gemacht werden (VALLEE und WACKER, 1970). Der Hinweis auf eine Metall-S-Protein-Bindung wurde durch die starke Inaktivierung mit dem Hg:EDTA-Kompley (1 : 1) erhalten. Da die Substrate die EDTA-Hemmung weitgehend aufheben, ist anzunehmen, daß das Metallion im katalytischen Zentrum sitzt und durch die Substrate gegen den EDTA-Angriff abgeschirmt wird. In diesem Zusammenhang müßte auch der Einfluß von EDTA auf die Inaktivierung durch CoA-SH näher geprüft werden. Das Produkt wird sicherlich an der Substratbindungsstelle gebunden, so daß sich mit der Annahme von Metall-S-Protein-Bindungen die starke Inaktivierung durch minimale CoA-SH-Konzentrationen (1 μM) aus der spezifischen Adsorption am katalytischen Zentrum und der Ausbildung von Metall-S-CoA- anstelle von Metall-S-Protein-Bindungen ergeben könnte. Bisher ist keine der in der Literatur beschriebenen IPM-Synthasen darauf untersucht worden, ob es sich um ein "metallo-protein" (VALLEE und WACKER, 1970, S. 25) handelt, obwohl die Enzyme aus Salmonella (KOHLHAW et al., 1969) und Micrococcus (FISCHER, 1973) durch 1 mM EDTA um 50 % gehemmt werden. Das Vorhandensein eines Metallions in der IPM-Synthase aus H 16 - A 81 ist nicht überraschend, da nach EGGERER und KLETTE (1967) die IPM-Synthase-Reaktion eine Aldolreaktion, und zwar eine Carboxymethylierung der Ketosäure, ist. Für diese Reaktion wurde von den Autoren die Beteiligung eines Metallions (Mg^{++} für die Malat-Synthase) formuliert, wobei das Metallion fest im Protein gebunden oder nur lose assoziiert sein kann, aber auch durch eine "konstitutiv im Protein enthaltene Lewis-Säure ersetzt" werden kann. Muß zur Erreichung der maxi-

malen Aktivität kein Metallion zugesetzt werden und läßt sich die Enzymaktivität in der gezeigten Weise durch Metallkomplexbildner hemmen und ausschalten, so liegt es nahe, für die IPM-Synthase ein "metallo-protein" anzunehmen.

Die aufgezeigten strukturellen Unterschiede machen sich auch im Verhalten des katalytischen Zentrums (Temperaturabhängigkeit und Substratsättigungsverhalten) bemerkbar.
FISCHER (1973) bestimmte für die angereicherte IPM-Synthase aus M. denitrificans eine Aktivierungsenergie von E_A^{br} = 18,3 kcal/Mol für den Temperaturbereich von 25 - 37° C. Diese hohe Aktivierungsenergie, die noch über der des durch L-Leucin gehemmten Enzyms aus H 16 - A 81 liegt, zeigt, daß im Vergleich dazu die IPM-Synthase aus H 16 - A 81 ein viel besserer Katalysator ist (E_A^{br} = 10 - 11 kcal/Mol). Für das Enzym aus M. denitrificans liegt bisher kein Wert für den Rohextrakt vor, so daß nicht beurteilt werden kann, ob die hohe Aktivierungsenergie evtl. auf eine Veränderung des Enzyms bei der Anreicherung zurückzuführen ist.
In diesem Zusammenhang soll auch erwähnt werden, daß nach MA und FISHER (1966) ein Vergleich der Aktivierungsenergien enzymatischer Reaktionen zur Klärung von systematischen Fragen herangezogen werden kann. Die Autoren gehen von der Annahme aus, daß sich während der Evolution das katalytische Prinzip eines Enzyms im Gegensatz zur Struktur des gesamten Enzyms nur sehr langsam veränderte. Deshalb sollte sich bei phylogenetisch verwandten Spezies die Aktivierungsenergie für eine bestimmte enzymatisch katalysierte Reaktion kaum unterscheiden, dagegen aber bei Bakterien mit phylogenetisch unterschiedlichem Ursprung.
Für die anderen untersuchten IPM-Synthasen liegen keine Daten zum Vergleich vor, so daß die These an diesem Beispiel nicht überprüft werden kann. Die Theorie ist sicherlich auf Enzyme von psychrophilen und thermophilen Organismen, d.h. von Organismen, die unter extremen Temperaturbedingungen leben, nicht anwendbar, da eine Adaption gerade über eine

Veränderung der Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität erfolgen kann (LOW et al., 1973). Da die Temperaturabhängigkeit bei anderen IPM-Synthasen nicht untersucht worden ist, ergab sich bezüglich der Temperaturanomalie keine Vergleichsmöglichkeit. Grundsätzlich zeigten TALSKY (1971) und HAN (1972) in ausführlichen Arbeiten an anderen Enzymsystemen und durch theoretische Berechnungen, daß in der Auftragung nach Arrhenius einzelne, fast sprunghafte Änderungen des Kurvenverlaufs, aber auch wellenförmige Kurven auftreten können. TALSKY (1971) wies nach, daß bei Anwendung entsprechend kleiner Temperaturintervalle die sprunghaft wirkenden Änderungen immer nur mehr oder weniger stark ab- oder aufknickende Kurvenzüge sind.

Da die enzymatisch katalysierten Reaktionen sehr komplex sind, insbesondere bei Mehr-Substrat-mehr-Produkt-Reaktionen, wie auch im vorliegenden Fall der IPM-Synthase, können die Änderungen in der Aktivierungsenergie E_A^{br} die verschiedensten Ursachen haben:

1. vorgetäuschte Anomalien durch a) eine stärkere Temperaturabhängigkeit der pH-Werte des Testpuffers und der Adsorptionskoeffizienten im optischen Test und durch b) die Addition der Aktivitäten von zwei verschiedenen Enzymformen, die die gleiche Reaktion katalysieren;

2. Änderung oder Wechsel des die Geschwindigkeit bestimmenden Schrittes bzw. verstärktes Auftreten oder Abnahme der Rückreaktion auf Grund einer unterschiedlichen Temperaturabhängigkeit der einzelnen kinetischen Konstanten;

3. a) Unterschiedliche Abhängigkeit der Bindungskonstanten für Substrate, Produkte oder Effektoren und b) Konformationsänderungen des Enzyms bei bestimmten Temperaturen mit einer Änderung der katalytischen Konstanten oder auch allosterischer Eigenschaften in Gegenwart der Effektoren;
4. eine Kombination der verschiedenen Möglichkeiten.

HAN (1972) trennte in seinen Modellberechnungen zur Temperaturanomalie

zwischen kinetischen und thermodynamischen Faktoren, die aber keine prinzipiell verschiedenen Kurven ergeben, so daß die Ursachen aus dem Verlauf der Kurven nicht zu erkennen sind. Umstritten ist auch, ob eine Unterteilung in thermodynamische und kinetische Ursachen sinnvoll ist, da jede Änderung einer kinetischen Konstante auch die thermodynamischen Konstanten ändert.

Im vorliegenden Fall kann eine Vortäuschung der Anomalien durch eine Temperaturabhängigkeit des Absorptionskoeffizienten im verwendeten Enzymtest oder des pH-Wertes des Puffersystems ausgeschlossen werden. Es wurde der fluorimetrische Test (Endpunktbestimmung bei konstanter Temperatur) neben einem kontinuierlichen optischen Test (bei 232 nm) und $(K,H)_3PO_4$-Puffer mit einem $\Delta pH/^{o}C = 0,0028$ verwendet. Desgleichen kann ein Einfluß der Rückreaktion verneint werden, da die Synthese des Produkts durch die Spaltung der energiereichen Thioesterbindung des Ac~SCoA nahezu irreversibel verläuft (WEBSTER und GROSS, 1965). Unwahrscheinlich ist auch auf Grund der gelelektrophoretischen Reinheit das Vorhandensein von zwei völlig verschiedenen Enzymen. Jedoch könnten die Bindungsstellen für die Substrate an einem Enzymmolekül unterschiedlich von der Temperatur beeinflußt werden, z.B. bei der Existenz nicht identischer Untereinheiten oder bei identischen Untereinheiten durch verschiedene Konformationen der Untereinheiten, oder auch beim Vorliegen von zwei nicht gleichen Bindungsstellen an einer Peptidkette.

Nach TALSKY (1971) sind beim Auftreten polyphasischer Kurven in der Arrhenius-Auftragung Konformationsumwandlungen des Enzyms sehr wahrscheinlich. Die anomale Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit ist als ein empfindlicher Indikator für das Reaktionsgeschehen am Enzym zu betrachten, wobei offenbar der Reaktionsablauf schon durch relativ kleine Konformationsänderungen, vor allem in der Umgebung des aktiven Zentrums, beeinflußt wird. Auch die stark veränderten Kurven in Gegenwart von L-Leucin und von L-Valin und L-Leucin deuten auf temperaturbedingte Konformationsumwandlungen hin.

Die Frage, ob Konformationsumwandlungen vorliegen oder ob andere Effekte zu den nicht linearen Kurvenverläufen führten, bestand auch bei der Deutung des Substratsättigungsverhaltens der IPM-Synthase.
In Tab. 24 sind die K_m-Werte für die Substrate KIV und Ac~SCoA zusammengefaßt. Für H 16 - A 81 sind die gemittelten K_m-Werte aus der Lineweaver-Burk-Auftragung angegeben.

Tab. 24 Vergleich der aus der Literatur entnommenen (app.) K_m-Werte für die Substrate mit den Werten für die IPM-Synthase aus H 16 - A 81

	Ac~SCoA (M)	KIV (M)
S. typhimurium (KOHLHAW et al., 1969)	$1,5 \times 10^{-4}$ (pH=7,5) 2×10^{-4} (pH=8,5)	6×10^{-5} (pH=8,5) $8,5 \times 10^{-5}$ (pH=7,5)
H 16 - A 81	$7,5 \times 10^{-5}$ (pH=8,2) $K_m' = 1,5 \times 10^{-5}$ $K_m'' = 1 \times 10^{-4}$ (pH=7,6)	6×10^{-5} (pH=8,2)
N. crassa (WEBSTER u. GROSS, 1965)	$2,4 \times 10^{-5}$ (pH=7,5)	1×10^{-5} (pH=7,5)
Saccharomyces spec. (ULM et al., 1972)	9×10^{-6} (pH=7,2)	$1,6 \times 10^{-5}$ (pH=7,2)
S. carlsbergensis (SAI et al., 1969)	-	$2,6 \times 10^{-5}$

Für Ac~SCoA liegen die Daten der IPM-Synthase aus H. eutropha zwischen denen, die für das Enzym aus Salmonella und denen, die für die pilzlichen Enzyme erhalten wurden; für KIV wurde die gleiche Affinität wie für das Enzym aus Salmonella gefunden.

Der entscheidende Unterschied zu den Enzymen aus den anderen Organismen liegt aber in dem Verlauf der Substratsättigungskurven. Für keine der angereicherten IPM-Synthasen wurden homotrope Effekte der Substrate gefunden. BAUMGARTEN (1969) fand zwar mit Rohextrakten aus Arthrobacter St. 23 bei der Substratsättigung der IPM-Synthase mit dem KIV-Homologen α-Ketovalerat eine starke Abweichung von einer Michaelis-Menten-Kinetik, so daß er zwei K_m-Werte angab; beim Substrat KIV und bei α-Ketobutyrat war die Abweichung nicht oder nur sehr schwach ausgeprägt, so daß BAUMGARTEN das Vorliegen zwei verschiedener Enzyme diskutierte.

KOHLHAW et al. (1969; S. typhimurium) fanden eine geringe Kooperativität bei der Substratsättigung von Ac~SCoA nur in Gegenwart von L-Leucin (heterotrope Effekte). Sie berechneten aus der Hill-Auftragung mindestens zwei Bindungsstellen für Ac~SCoA.

Die für die IPM-Synthase aus H 16 - A 81 erhaltenen Substratsättigungskurven sind sowohl für KIV als auch für Ac~SCoA ungewöhnlich. Beide Substrate bewirken homotrope Effekte, die sich mit fortschreitender Substratsättigung mehrfach ändern. Aus den Maximalwerten der erhaltenen Hill-Koeffizienten ergeben sich mindestens vier Bindungsstellen für Ac~SCoA und mindestens drei für KIV. Auf Grund des Verlaufs der Substratsättigungskurven in der Hill-Auftragung werden sowohl negative als auch positive Kooperativitäten für die Substrate, d.h. für den jeweils gleichen Liganden postuliert.

Unter positiver Kooperativität versteht man, daß durch die Bindung eines Liganden die Bindung des zweiten oder auch weiterer Liganden begünstigt wird. Solche Wechselwirkungen wurden erstmals 1904 durch BOHR et al. am Hämoglobin beobachtet. 1965 wurde die positive Kooperativität durch MONOD et al. und in erweiterter Form durch KOSHLAND et al. (1966) auch in theoretischen Modellen beschrieben.

Die p o s i t i v e Kooperativität galt längere Zeit als die einzige Form der Wechselwirkung zwischen identischen Liganden (homotrope Effekte). Doch CONWAY und KOSHLAND entdeckten 1968 an der Glyceraldehyd-3-

phosphat-Dehydrogenase die n e g a t i v e Kooperativität, bei der durch die Bindung eines Liganden die Bindung des zweiten bzw. weiterer Liganden erschwert wird. LEVITZKY und KOSHLAND (1969) zeigten für mehrere Enzyme aus den in der Literatur angegebenen Daten, daß die negative Kooperativität nicht auf eine bestimmte Art von Enzymen beschränkt ist, und deuteten den Effekt mit Hilfe des sequentiellen Mechanismus.
Der Effekt der negativen Kooperativität kann durch folgende molekulare Ereignisse verursacht werden:

1. durch eine durch den Liganden hervorgerufene Konformationsänderung des Proteins, die die Wechselwirkungen der Untereinheiten beeinträchtigt;
2. durch elektrostatische Abstossungen zwischen den Liganden;
3. durch identische Peptidketten mit aktiven Zentren, deren Bindungskonstanten sich für den Liganden unterscheiden;
4. durch zwei oder mehrere polymorphe Formen desselben Enzyms;
5. durch geometrische Anordnungen von identischen Untereinheiten, welche nicht identische Bindungsstellen hervorrufen und
6. durch eine Kombination zweier oder mehrerer der genannten Möglichkeiten.

Die negative Kooperativität läßt sich nach den gleichen Autoren nur mit dem "sequentiellen Modell" (CONWAY und KOSHLAND, 1969) erklären, nicht aber mit dem Symmetrie-Modell von MONOD, WYMAN und CHANGEAUX (1965).
Substratsättigungskurven mit ähnlichen Abweichungen von einer Michaelis-Menten-Kinetik, wie sie für die IPM-Synthase aus H 16 - A 81 gefunden wurden, sind auch für andere Enzyme beschrieben worden (LEVITZKY und KOSHLAND, 1969; SOBERANO und SCHOELMANN, 1972; TEIPEL und KOSHLAND, 1969 mit mehreren Literaturbeispielen). TEIPEL und KOSHLAND (1969) nannten die erhaltenen Kurven "bumpy curves". Sie zeigten

durch Berechnungen auf der Grundlage des Sequentiellen Mechanismus, daß solche Substratsättigungskurven nur bei Enzymen auftreten können, die mehr als zwei Bindungszentren haben, wobei diese entweder a priori verschiedene Konstanten für die Bindung der Liganden aufweisen oder aber die Affinität der zweiten Bindungsstelle bei der Bindung des ersten Liganden verändert wird. Ein allmählicher Wechsel der Bindungs- und / oder der kinetischen Konstanten kann jedoch keine "bumpy curves" verursachen.

Für den postulierten Wechsel von positiver zu negativer und wiederum zu positiver Kooperativität für das Substrat KIV bei der Substratsättigung der IPM-Synthase aus H 16 - A 81 muß man dann wenigstens 4($n_H > 2$) Bindungsstellen fordern. Die nur teilweise sichtbaren weiteren Unstetigkeiten in den Substratsättigungskurven (es müßten dazu noch detailliertere und statistisch abgesicherte Substratsättigungskurven aufgenommen werden) lassen noch weitere Bindungsstellen vermuten.

Für das Substrat Ac~SCoA müssen unter der Annahme der mehrfachen Änderung der Kooperativität, wie man aus der Hill-Auftragung der Substratsättigungskurven vermuten kann, mindestens 6 Bindungsstellen gefordert werden. Mit dieser Vorstellung steht die Erklärung, daß der höhere Hill-Koeffizient des Produktes CoA-SH ($n_H' \sim 5$) gegenüber dem Substrat Ac~SCoA ($n_H > 3$) auf einer stärkeren kooperativen Wechselwirkung beruht, im Einklang.

Die Stärke der Zwischenmaxima und der Plateaus bei den "bumpy curves" ist nach TEIPEL und KOSHLAND (1969) von dem Verhältnis der einzelnen wahren Bindungskonstanten (K'_i = intrinsic binding constants), der einzelnen -(i-ten)-Zentren und der jeweiligen wahren kinetischen Konstanten (k_i = intrinsic catalytic constants) der verschiedenen Gleichgewichte abhängig. Die Größe der Unterschiede in den kinetischen Konstanten ist wahrscheinlich ausschlaggebend für den Verlauf der Substratsättigungskurven.

Daraus ergibt sich, daß die Angabe von zwei, bzw. drei K_m-Werten aus der Lineweaver-Burk-Auftragung, wie es auch bei vielen anderen Enzymen

erfolgte (LeJOHN und JACKSON, 1968; BAUMGARTEN, 1969; DATTA, 1971), für eine erste Charakterisierung des Enzyms und für Vergleiche mit anderen Enzymen sinnvoll ist, daß aber diese Konstanten keine echten Angaben über das Gleichgewicht der Reaktionen bzw. über die Bindungsverhältnisse der einzelnen Zentren ergeben. Diese lassen sich bei genauer Kenntnis des Molekulargewichtes sowie der Anzahl an identischen und nicht identischen Untereinheiten annäherungsweise mathematisch bestimmen, indem theoretische Kurven den experimentellen durch Verändern der einzelnen K'_i- und k_i-Werte angeglichen werden.

TEIPEL und KOSHLAND (1969) weisen daraufhin, daß man bei einigen der erhaltenen "bumpy curves" (z. B. der CTP-Synthetase) annehmen muß, daß die schnelle Einstellung des Gleichgewichtes $E + S \rightleftharpoons ES$ gegenüber der katalytischen Umsetzungsrate $ES \rightleftharpoons EP$, wie für alle Steady-State-Kinetiken vorausgesetzt wird, nicht mehr vorhanden ist, sondern daß man als geschwindigkeitsbegrenzenden Schritt die Substratbindung oder auch Konformationsumwandlungen annehmen muß.

Die "bumpy curves" wurden nicht nur bei der Substratsättigung mit KIV, sondern auch mit den umgesetzten α-Ketohomologen gefunden; diese Kurven zeigen z. T. den abnormen Kurvenverlauf noch prägnanter als das Substrat KIV. Auf Grund dieser Beobachtung wird vermutet, daß die von BAUMGARTEN (1969) bei der IPM-Synthase aus Arthrobacter St. 23 gefundenen Abweichungen von einer Michaelis-Menten-Kinetik bei der Substratsättigung mit den α-Ketosäurehomologen (für KIV ist eine geringe Abweichung auf Grund weniger Punkte kaum zu sehen) auf einen ähnlichen Substratsättigungsmechanismus zurückgeführt werden können, d. h. auf homotrope Effekte mit einem Wechsel von positiver und negativer Kooperativität.

Die in H. eutropha H 16 - A 81 aufgezeigte Unspezifität der α-IPM-Synthase hinsichtlich der Substratverwendung der α-Ketosäuren stimmt mit den Ergebnissen bei den anderen Organismen weitgehend überein. So finden alle Autoren für α-KIV auch den kleinsten K_m-Wert und für α-Ketobutyrat

die größte Umsetzungsrate. Am stärksten divergieren die angegebenen (app.) K_m-Werte (bzw. $K_{0.5}$-Werte) für Pyruvat: Von 1×10^{-2} M in S. typhimurium (auch in H 16 - A 81) bis 2×10^{-4} M in Saccharomyces spec. Desgleichen unterschieden sich die relativen v_{max}-Werte: Am schnellsten wird Pyruvat in S. carlsbergensis und am langsamsten in Saccharomyces spec. umgesetzt; die relativen v_{max}-Werte betragen 2,6 bzw. 0,59, bezogen auf v_{max} für α-KIV = 1.

α-Keto-n-valerat wird von der IPM-Synthase aus Saccharomyces spec. anscheinend nicht umgesetzt, da die Autoren nur einen K_i-Wert angeben, während bei dem Enzym aus S. typhimurium und H 16 - A 81 für α-Keto-n-valerat eine zwar geringere als für α-KIV, aber deutliche Umsetzung gefunden wurde. In Rohextrakten von Arthrobacter St. 23 fand BAUMGARTEN (1969) für α-Keto-n-valerat eine schnellere Umsetzung als für KIV; der K_m-Wert für α-Keto-n-valerat war sogar kleiner als der für KIV.

Die (app.) K_m-Werte und rel. v_{max}-Werte der α-Ketosäuren für die bisher gereinigten Enzyme sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tab. 25 Vergleich der aus der Literatur entnommenen (app.) K_m- und rel. v_{max}-Werte für die α-Ketosäuren

	WEBSTER und GROSS 1965 Neurospora crassa		KOHLHAW et al. 1969 Salmonella typhimurium		SAI et al. 1969 Saccharomyces carlsbergensis		ULM et al. 1972 Saccharomyces spec.		Hydrogenomonas eutropha H 16	
α-Ketosäure	app. K_m [M]	rel. V_{max}	app. K_m [M]	rel. V_{max}	app. K_m [M]	rel. V_{max}	app. K_m [M]	rel. V_{max}	$K_{0.5}$ [M]	rel. V_{max}
α-Keto-Isovalerians.	1×10^{-5}	1	6×10^{-5}	1	$2,6 \times 10^{-5}$	1	$1,6 \times 10^{-5}$	1	6×10^{-5}	1
α-Keto-n-Valerians.	-	-	-	0,3	-	-	$K_i = 2,5 \times 10^{-4}$	-	5×10^{-4}	0,6
α-Keto-Buttersäure	$2,1 \times 10^{-3}$	>1	$1,1 \times 10^{-3}$	3	+	-	$5,7 \times 10^{-4}$	4,16	$1,8 \times 10^{-3}$	3,4
Brenztraubensäure	$5,8 \times 10^{-3}$	-	1×10^{-2}	1,5	$2,3 \times 10^{-3}$	2,6	2×10^{-4}	0,59	1×10^{-2}	≈1

J.L. CANOVAS et al. (1965) behaupteten, im Hefeextrakt seien für die Umsetzung von α-Ketobutyrat mit Ac~SCoA und von KIV mit Ac~SCoA verschiedene Enzyme anzunehmen. Sie fanden bei einer Ammoniumsulfatfraktionierung ihrer Extrakte eine Änderung im Verhältnis der Umsetzung von α-Ketobutyrat zu KIV.
Dagegen bezweifeln die in der Tab.25 aufgeführten Autoren nicht, daß es sich bei den Umsetzungen um eine Unspezifität der IPM-Synthase handelt, da die gemessenen Enzymreaktionen durch L-Leucin gehemmt wurden bzw. eine Enzymanreicherung bis zur Homogenität in der Ultrazentrifuge vorlag.

Auch für die in dieser Arbeit gezeigten Umsetzungen der α-Ketosäuren mit Ac~SCoA kann auf Grund des Anreicherungsgrades und der Hemmung durch L-Leucin die Unspezifität der IPM-Synthase aus H 16 - A 81 verantwortlich gemacht werden.
Dabei liegt bisher noch keine sinnvolle Erklärung für die größere Umsetzungsgeschwindigkeit von α-Ketobutyrat gegenüber KIV, bei gleichzeitig geringerer Affinität des Enzyms zur α-Ketobuttersäure, vor.

Eine Unspezifität für die Acyl~SCoA-Komponente ist bisher von anderen Autoren nicht beschrieben worden, so daß kein Vergleich möglich ist. Auf Grund der für alle untersuchten IPM-Synthasen gefundenen Unspezifität für die α-Ketosäuren kann man erwarten, daß es sich bei der Unspezifität für die Acyl~SCoA-Verbindungen nicht um eine Besonderheit des Enzyms aus H. eutropha handelt.
Eine Kondensation verschiedener Acyl~SCoA-Verbindungen mit Glyoxylat zeigte die Arbeitsgruppe um AJL (WEGENER et al., 1965, 1968) in Extrakten von E. coli. Sie machte für die Reaktionen verschiedene, zum Teil induzierbare Enzyme verantwortlich: Malat-Synthase (REEVES et al., 1961), ß-Äthylmalat-Synthase (RABIN et al., 1963), ß-n-Propylmalat-Synthase (IMAI et al., 1963, 1964) und α-Hydroxyglutarat-Synthase (REEVES et al., 1963). Diese Enzyme können für die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Reaktionen mit den verschiedenen Acyl~SCoA-Verbindungen ausgeschlossen

werden, da Glyoxylat weder umgesetzt wurde noch eine hemmende Wirkung hatte und wahrscheinlich von dem reagierenden Enzym gar nicht gebunden wird. Eine unspezifische Kondensation durch die Citrat-Synthase, welche Ac~SCoA und Oxalacetat zu Citrat verbindet, kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da Oxalacetat hier nicht als Substrat wirksam war.
Als indirekten Beweis, daß es sich bei den Kondensationen der verschiedenen Acyl~SCoA-Verbindungen mit den α-Ketosäuren um die Unspezifität der IPM-Synthase handelt, kann man die Hemmung durch L-Leucin sehen. Es ist keine weitere Synthase bekannt, bei der eine Regulation durch L-Leucin in dem gezeigten Ausmaße sinnvoll wäre, und die außerdem zu KIV und Ac~SCoA die größte Affinität hat.
Als ein Hinweis, daß dieses Biosyntheseenzym evtl. auch noch andere Funktionen in der Zelle ausübt, mag die nicht vollständige Hemmung zu 100 % durch L-Leucin gelten, wobei auf molekularer Ebene diese Eigenschaft wahrscheinlich auf dem Mechanismus der negativen Kooperativität beruht.

HILL (1968) zeigte, daß seine auxotrophen Mutanten von H. eutropha H 16, wenn sie mit 14 C-1 Acetat und einer Aminosäure - Alanin, α-Aminobuttersäure oder Norvalin - inkubiert wurden, die korrespondierende, um ein C-Atom verlängerte, radioaktive Aminosäure, d.h. α-Aminobuttersäure bzw. Norvalin oder Norleucin, ins Medium ausschieden. Damit wäre eine Unspezifität für die Enzyme des gesamten Leucinbiosyntheseweges wahrscheinlich.
Eine Unspezifität der α-IPM-Isomerase und der α-IPM-Dehydrogenase in Pseudomonas aeruginosa wurde durch RABIN et al. (1968) bereits beschrieben.
Schon länger waren Hinweise auf eine Unspezifität der an der Leucinbiosynthese beteiligten Enzyme für Hefen bekannt. So wurden diese Enzyme für die Fuselölbildung beim Abbau exogener Aminosäuren verantwortlich gemacht (EHRLICH, 1907; NEUBAUER und FROMHERZ, 1911). INGRAHAM und seine Mitarbeiter (1960, 1961, 1963) und GUYMON (1966) zeigten mit

Hilfe von Markierungsexperimenten an auxotrophen Mutanten von Saccharomyces cerevisiae, daß die Leucinbiosyntheseenzyme auch an der Bildung der höheren Alkohole (n-Propanol bis n-Hexanol) beteiligt sind. Die Kondensation von α-Ketosäuren mit Ac~SCoA muß dabei als einleitender Schritt betrachtet werden, dem dann die anderen Schritte der Leucinbiosynthese bis zur um ein C-Atom verlängerten α-Ketosäure folgen. Diese kann dann ggf. um ein weiteres C-Atom verlängert werden. Anschließend erfolgt eine Decarboxylierung zum Aldehyd, welcher zum entsprechenden Alkohol reduziert wird.

REH (unveröffentl. Ergebnisse) macht ebenfalls die Leucinbiosyntheseenzyme für die Bildung von α-Ketobuttersäure aus Pyruvat und Ac~SCoA in einer Revertante einer isoleucinauxotrophen Mutante von H. eutropha H 16 verantwortlich. In der Mutante und Revertante ließ sich keine Threonindesaminase nachweisen, so daß die Zellen keine α-Ketobuttersäure für die Isoleucinsynthese bereitstellen konnten. Die Bildung von α-Ketobuttersäure durch die IPM-Synthase wurde durch Markierung mit radioaktivem Acetat wahrscheinlich gemacht.

Die geschilderten Umsetzungen scheinen jedoch Ausnahmen zu sein. Man muß annehmen, daß der Anteil solcher Reaktionen in der Zelle sehr klein ist und die von der Leucinbiosynthese her gesehenen "Fehlkondensationen" für den Organismus normalerweise keine Benachteiligung bringen, so daß es auch nicht notwendig war, spezifischere Enzyme zu selektieren. Es reichte aus, daß das entstehende α-Ketoisocaproat sowie die Ketovorstufe des L-Isoleucin, 2-Keto-3-methyl-valeriansäure, durch die IPM-Synthase nicht weiter umgesetzt werden können. Unter extremen Verhältnissen oder durch Mutationen bedingt, ermöglicht aber die gezeigte Unspezifität der Zelle, benötigte Metabolite unter Umständen über diesen Umweg zu synthetisieren.

Die starke Hemmung (95 %) durch Palmityl~SCoA muß, trotz der eingesetzten geringen Konzentration von 9×10^{-6} M, als eine in vitro-Reaktion ohne physiologische und regulatorische Relevanz aufgefaßt werden. Ähnliche Hemmeffekte sind auch für andere Enzyme z. B. für die Citratsynthase und

Ac~SCoA-Carboxylase beschrieben worden. Doch nur für die Ac~SCoA-Carboxylase der Fettsäuresynthese konnten BORTZ und LYNEN (1963) nachweisen, daß Palmityl~SCoA wirklich als Endproduktinhibitor wirkt (VAGELOS, 1971). TUBBS (1963) und WIELAND und WEISS (1963) waren zwar auch der Meinung, daß Palmityl~SCoA, da es die in vitro-Kondensation von Oxalacetat mit Ac~SCoA zu Citrat hemmte und das kondensierende Enzym inaktivierte, die Citrat-Synthase reguliert und damit über die Citratkondensation in der Zelle indirekt die Fettsäuresynthese beeinflußt; denn letztere wird durch Citrat stimuliert. Doch konnte SRERE (1965) zeigen, daß die Inaktivierung durch 1×10^{-6} M Palmityl~SCoA bei der Citrat-Synthase wie bei vielen anderen Enzymen eine unspezifische Reaktion ist und auf einer Veränderung der quartären bzw. tertiären Proteinstruktur durch Adsorption von Palmityl~SCoA beruht. Die Inaktivierung ist irreversibel. Sie kann aber durch Rinderserumalbumin z.T. verhindert werden, da dieses auch unspezifisch Palmityl~SCoA adsorbiert (VAGELOS, 1971).

Zwischen dem Palmitylrest und den apolaren Regionen des Enzyms können z.T. apolare Wechselwirkungen angenommen werden. DORSEY und PORTER (1968) machten wahrscheinlich, daß in vielen Fällen ein molares Verhältnis zwischen der Proteinmenge und der zur Inaktivierung benötigten Menge an Palmityl~SCoA besteht.

Wäre für die Citrat-Synthase eine Regulierung durch Palmityl~SCoA vielleicht noch sinnvoll, so ergäben sich in dieser Hinsicht für die IPM-Synthase keine plausiblen Deutungsmöglichkeiten.

Die Synthesereaktion der IPM-Synthase entspricht chemisch einer Aldolreaktion, d.h. der nukleophilen Addition einer C-H aciden Verbindung an die elektrophile Carbonylfunktion. Von daher ist es nicht erklärlich, warum die IPM-Synthase im "Enzyme Handbook" (BARMAN, 1969) unter E.C.2.3.1.c eingeordnet worden ist; in dieser Gruppe sind Acyltransferasen zusammengefaßt. Durch die IPM-Synthase wird aber kein Acyl(CH_3-C$\leftrightharpoons$O)-Rest übertragen, sondern im Prinzip ein Carboxymethyl($\leftarrow CH_2$-COOH)-Rest. Es erscheint richtiger, die IPM-Synthase als C - C -Ligase (E.C.4.1.3-Gruppe)

neben die Citrat-Synthase (E.C.4.1.3.7), Malat-Synthase (E.C.4.1.3.2) und α-(n-Propyl)malat-Synthase (E.C.4.1.3.10) einzuordnen.

Die katalytische Funktion des Enzyms wird neben der richtigen räumlichen Annäherung der Reaktanten in einer Polarisierung der beiden reagierenden Komponenten liegen, d.h. der Erhöhung der Acidität der C-H Bindung und der Erhöhung der Nucleophilie der Carbonylgruppe. Die für die Reaktion optimale räumliche Anordnung ist natürlich von der Struktur des katalytischen Zentrums abhängig, wobei man erwarten kann, daß dieses für die physiologisch "natürlichen" Substrate spezifisch ist. Dies trifft, für die Affinität der IPM-Synthase zu den Substraten auch zu: KIV und Ac~SCoA haben die kleinsten $K_{0,5}$-Werte; jedoch werden diese Verbindungen nicht am schnellsten in der enzymkatalysierten Reaktion umgesetzt.

Wie die Citrat-Synthase (EGGERER, 1965) müßte auch die IPM-Synthase beim adolartigen Synthese-Verlauf formal drei Schritte katalysieren:

1. Enolisierung des Ac~SCoA,
2. Addition des enolischen Ac~SCoA an KIV zu α-Isopropylmalyl~SCoA und
3. dessen Hydrolyse zu IPM und CoA-SH.

Dabei entsteht kein Ac-Enzym, was mit der Annahme, daß die Substratbindung nach einem Random-Mechanismus erfolgt, übereinstimmt. Ein Ac-Enzym wäre dagegen bei einem Ping-Pong-Mechanismus zu fordern (STEWART und RUDNEY, 1966; MIDDLETON, 1967).

Vergleicht man die Reaktionsfähigkeit der geprüften Acyl~SCoA-Verbindungen in der enzymatischen Umsetzung mit der entsprechender Acyl-Ester in einer chemischen Adolkondensation, so ergeben sich auffällige Unterschiede. Während Malonyl~SCoA und besonders Acetacetyl~SCoA von der IPM-Synthase schlechter umgesetzt werden als Ac~SCoA, reagieren Malonsäurediester und Acetessigsäureester auf Grund der doppelten Carbonylfunktion in Nachbarstellung zur aciden C-H-Bindung bei der chemischen Kondensation weitaus besser als ein Acetylester. Die Spezifität der IPM-Synthase läßt demnach die rein chemische Reaktivität dieser Acylkomponenten nicht zur Wirkung kommen.

Ersetzt man andererseits ein H-Atom am α-C-Atom der C-H aciden Adolkomponente durch einen aliphatischen Rest wie $-CH_3$ oder $-CH_2-CH_3$, so wird die Reaktionsfähigkeit für die Adolkondensation herabgesetzt. Für Acyl~SCoA entspricht diese Substitution dem Übergang von Acetyl~SCoA zu Propionyl~SCoA oder Butyryl~SCoA; dabei erhält man - mit KIV als Carbonylkomponente - auch in der enzymatisch katalysierten Reaktion eine Verringerung der Umsetzungsgeschwindigkeit. Doch die schnellere Umsetzung von Pyruvat mit Propionyl~SCoA ist dann wiederum nur auf eine enzymatische Eigenschaft zurückzuführen.

Die Verwendung der Unspezifität der IPM-Synthase für eine präparative Darstellung von Äpfelsäurederivaten auf enzymatischem Wege ist uninteressant, da diese Verbindungen sehr gut und weitaus billiger durch eine rein chemische Synthese (Adolreaktion mit Acetessigesterderivaten oder Malonsäurediesterderivaten) zu erhalten sind. Diese Adolreaktion liefert aber ein Gemisch der Stereoisomeren. Eine Auftrennung in die einzelnen Komponenten ist in einigen Fällen sehr aufwendig. Hier könnte eine enzymatisch katalysierte Synthese von Interesse werden, da diese stereospezifisch abläuft.

Die absolute Konfiguration des enzymatisch gebildeten IPM ist bisher noch nicht bestimmt worden. Nach BENTLEY (1969/70) gehört die IPM-Synthase zum Typ der R-Citrat-Synthase und der Homocitrat-Synthase, so daß R-α-Isopropylmalat entstehen sollte. Von CALVO et al. (1964) wurde für ß-IPM aus N. crassa die erythro-D_S-Konfiguration nachgewiesen. (ß-IPM entsteht in der Leucinbiosynthese durch enzymatische Isomerisierung aus α-IPM.) Desgleichen ist in Ps. aeruginosa nur erythro-ß-Äthylmalat biologisch aktiv (RABIN et al., 1968).

Nach SAI ist das in Extrakten aus Saccharomyces spec. (SAI et AMAHA, 1965) und aus S. carlsbergensis (SAI et al., 1969) durch die IPM-Synthase gebildete α-Methylmalat linksdrehend. Ebenso ist das in Mutanten von S. cerevisae gebildete IPM linksdrehend (SAI, 1968). REH (unveröffentl. Ergebnisse) zeigte, daß auch die α-Methyläpfelsäure (α-Citratmalat), die in Rohextrakten aus H. eutropha H 16 synthetisiert wird und für deren Bildung

die IPM-Synthase verantwortlich gemacht wird, linksdrehend ist. Dagegen ist das α-Citratmalat aus Clostridium tetanomorphum (BLAIR und BARKER, 1966) und das aus Pseudomonas fluorescens (KATSUKI et al., 1962), welches aus Glutamat über ß-Methylaspartat und Mesaconat gebildet wird, rechtsdrehend.
Die Bestimmung der Konfiguration der in dieser Arbeit beschriebenen möglichen Produkte der IPM-Synthase bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Für das Endprodukt der Synthesekette konnte gezeigt werden, daß die IPM-Synthase spezifisch für die L-Konfiguration von Leucin und dessen Strukturanaloge ist. D-Valin, D-Isoleucin und D-Leucin hatten nahezu keine Wirkung auf die Enzymaktivität.
Der Einfluß von L-Valin und L-Isoleucin auf die Hemmung durch L-Leucin - zum ersten Male durch HILL (1968) für die IPM-Synthase in Rohextrakten von H. eutropha H 16 und M. denitrificans beschrieben - wurde bisher für kein weiteres Enzym nachgewiesen. Beide Aminosäuren bewirken in den anderen Organismen eine verschieden starke Hemmung der IPM-Synthase-Aktivität. So wurde die Aktivität des Enzyms
aus Maiskeimen (OAKS, 1965) durch 5 mM L-Isoleucin um 20 %,
durch 5 mM L-Valin um 28 %,
aus N. crassa (WEBSTER und GROSS, 1965) durch 10 mM L-Isoleucin um 63 %, durch 10 mM L-Valin um 20 % und
aus S. carlsbergensis (SAI et al., 1969) durch 5 mM L-Isoleucin um 50 % und durch 5 mM L-Valin um 11 % gehemmt.
In Saccharomyces spec. hatten die Aminosäuren keine Wirkung. Doch wurde, wie auch bei den anderen Organismen, nur der Einfluß von L-Valin und L-Isoleucin in Abwesenheit von L-Leucin geprüft.
Im Gegensatz dazu konnte FISCHER (1973) zeigen, daß bei der IPM-Synthase aus M. denitrificans die durch 0,2 mM L-Leucin bewirkte Hemmung durch 5 mM L-Isoleucin von 74,8 % auf 25,5 % und durch 5 mM L-Valin auf 7,5 % erniedrigt wird.

Beim Enzym aus H 16 - A 81 erniedrigt 1 mM L-Valin die durch 5×10^{-5} M L-Leucin bewirkte Hemmung von 85,7 % auf 34,5 % und 1 mM L-Isoleucin auf 50 %. Eine hemmende Wirkung von L-Valin (2,5 mM) wurde erst bei höheren pH-Werten als 8,5 gefunden. Während in M. denitrificans noch L-Cystein, L-Methionin, L-Phenylalanin und L-Tryptophan die Hemmung durch L-Leucin verringerten (FISCHER, 1973), hatten diese Aminosäuren bei dem Enzym aus H 16 - A 81 keinen signifikanten Einfluß.

Von Interesse war nun einerseits die Frage nach der physiologischen Relevanz der Reaktivierung und andererseits nach der Bindungsstelle von L-Valin und L-Isoleucin. Auf Grund der starken Wirkung bei physiologischen Konzentrationen kann man zumindest der Reaktion mit L-Valin eine physiologische Bedeutung zusprechen. Durch die antagonistische Wirkung von L-Valin und L-Isoleucin gegenüber L-Leucin hat H. eutropha neben der Repression, Derepression und der Endprodukthemmung eine weitere Möglichkeit, eine ausgewogene Synthese der verzweigten Aminosäuren zu erreichen. Offen bleibt die Frage, warum die Regulationsmöglichkeit nicht in anderen Organismen ausgenutzt wird.

Die zweite Frage, ob L-Valin und L-Isoleucin echte allosterische Effektoren sind und von L-Leucin getrennte Bindungsstellen haben oder ob sie nur als nicht hemmende L-Leucin-analoge die Bindung des Leucins verringern, läßt sich noch nicht mit Sicherheit beantworten. Die Wirkungslosigkeit von L-Valin auf das für L-Leucin insensitive Enzym kann sowohl auf dem Verlust der Fähigkeit zur allosterischen Umwandlung als auch auf der Blockierung des gemeinsamen Bindungszentrums beruhen. Hinweise auf eine vom L-Leucin verschiedene Bindung von L-Valin sind

1. der verschieden starke Einfluß auf die Inaktivierung durch EDTA (pH = 6,2), CoASH und CH_3-CH_2SH,
2. die Unterschiede in der Wirkung der Aminosäuren auf die Ausprägung der Temperaturanomalie und
3. die Verschiebung des pH-Optimums für die durch L-Leucin hervorgerufene Hemmung in Gegenwart von L-Valin (pH = 7,4 pH = 7,0).

Bei der Annahme von gemeinsamen Bindungsstellen für L-Leucin und L-Valin ist nicht zu erklären, warum durch L-Valin die Temperaturanomalie stark ausgeprägt wird, aber mit L-Valin in Gegenwart von L-Leucin nur eine schwache Anomalie gefunden wurde, obwohl die Valin-Konzentration so hoch war, daß die Hemmung durch L-Leucin aufgehoben war und somit L-Leucin vom Enzym hätte verdrängt sein müssen.

Abschließend kann man feststellen, daß bei dem Vergleich der IPM-Synthasen aus den verschiedenen Organismen keine spezifischen Eigenschaften für die pilzlichen einerseits und die bakteriellen Enzyme andererseits erhalten wurden, so wie es ULM et al. (1972) auf Grund des Vergleichs der Enzyme von S. typhimurium, N. crassa und Saccharomyces spec. vermuteten und wie es auch in gewisser Weise die Untersuchungen von FISCHER (1973) ergaben. Das Enzym aus H 16 - A 81 gleicht in einigen Eigenschaften mehr dem Enzym aus Saccharomyces spec. (z.B. Leucinhemmung), in anderen mehr dem aus S. typhimurium (z.B. Substratspezifität) und in anderen wiederum verhält es sich vollkommen anders (z.B. SH-Gruppentitration).
Für die weiteren Untersuchungen wird, da das Enzym aus M. denitrificans mehr dem aus S. typhimurium entspricht, andererseits für die IPM-Synthase aus Arthrobacter St. 23 eine ähnlich ungewöhnliche Substratsättigung angenommen werden kann wie für das Enzym aus H 16 - A 81, die Arbeitshypothese aufgestellt, daß sich die bakteriellen IPM-Synthasen zwei Typen zuordnen lassen. Bei dem einen Typ verläuft parallel zur Hemmung durch L-Leucin eine Dissoziation in Untereinheiten, während bei dem anderen durch die Bindung von L-Leucin nur verhältnismäßig geringe Konformationsänderungen bewirkt werden. Die Substratsättigung für den ersten Typ ergibt normale Michaelis-Menten-Kinetiken, während für den anderen komplizierte Sättigungskurven erhalten werden.
Die Untersuchungen der IPM-Synthasen aus weiteren Organismen müssen zeigen, ob diese Vermutung zutrifft und ob sich evtl. Zusammenhänge zwischen der "Verwandtschaft" der Organismen und dem Vorhandensein der Enzymformen finden lassen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die α-Isopropylmalat(IPM)-Synthase aus H. eutropha H 16 wird durch Repression und Derepression ihrer Biosynthese reguliert. Während einer Wachstumsperiode (heterotrophe Bedingungen) liegt die höchste spezifische Aktivität (10 - 12 E/g Protein) am Ende der logarithmischen Phase vor. Unter autotrophen Bedingungen betrug diese ca. 6,5 E/g Protein.
Eine Derepression konnte durch die Zugabe von L-Isoleucin (1,4fach), L-Isoleucin und L-Valin (4,5fach) und α-Ketobuttersäure (2,5fach) zum Kulturmedium erzielt werden.
Eine Repression bewirkten L-Valin (Herabsetzung der spezif. Enzymaktivität auf 67 %) und L-Leucin (auf 50 %), letztere auch in Gegenwart von L-Isoleucin und/oder L-Valin.
Die Regulation durch Repression und Derepression erfolgt anscheinend durch die L-Leucin-Konzentration in der Zelle; ein indirekter Einfluß durch L-Valin und L-Isoleucin ist über die Regulation der Bildung der α-Ketoisovaleriansäure (KIV), dem Substrat der IPM-Synthase, möglich.

2. Isoenzyme mit einer unterschiedlichen Regulation ließen sich nicht nachweisen.

3. Die IPM-Synthase wurde in der L-Valin und L-Isoleucin doppelauxotrophen Mutante H. eutropha H 16 - A 81 durch Anzucht unter Derepressionsbedingungen bis auf das 30fache, bei der Anzucht größerer Zellmengen (100 l Fermenter) bis auf das 10fache der Aktivität im Wildtyp angereichert.

4. Das Enzym ist im Rohextrakt instabil; auch durch die Hemmung von Proteasen gelang keine vollständige Stabilisierung. Ausgehend von dem biologisch angereicherten Enzym konnte durch biochemische Methoden (Ammoniumsulfatfraktionierung, Ionenaustauscherchromatographie und Gelfiltration) eine spezifische Aktivität von 12 000 E/g Protein erreicht werden.

Das angereicherte Enzym war gelelektrophoretisch rein, obwohl es, je nach Bedingung, in 4 - 5 Proteinbanden, von denen 2 - 3 IPM-Synthase-Aktivität zeigten, zerfiel. Die Aufspaltung des Enzyms konnte durch keine Zusätze verhindert werden und erfolgte auch bei der Re-Gelelektrophorese der langsamsten Proteinbande.

5. Die IPM-Synthase aus H 16 - A 81 ist nicht partikelgebunden, wird aber auf Grund von sauren Gruppen am Protein leicht durch basisch reagierende Komponenten im Extrakt adsorbiert. Der Isoelektrische Punkt liegt zwischen pH = 3,9 und 4,0. Das Molekulargewicht wurde nach zwei voneinander unabhängigen Methoden zu 115 000 bzw. 114 300 und in Gegenwart von L-Leucin zu 100 000 bestimmt. Das Protein enthält keine freien SH-Gruppen, dagegen Disulfidbrücken bzw. maskierte SH-Gruppen; es hat wahrscheinlich ein Metallion gebunden, das für die katalytisch aktive Struktur des Proteins verantwortlich ist und nur irreversibel entfernt werden konnte. Das Enzym besteht aus mehreren (evtl. 6) Untereinheiten.

6. Das gereinigte Enzym war bei geringen Temperaturen sehr labil. Die Kältelabilität konnte auf hydrophobe Wechselwirkungen der Seitenketten im Protein zurückgeführt werden.
Das Temperaturoptimum für die katalytische Aktivität lag bei 44° C, in Gegenwart von L-Leucin bei 48° C. Die Aktivierungsenergie E_A^{br} wurde zu ca. 11 kcal/Mol bei pH = 7,5 und pH = 8,2 und zu 21 kcal/Mol in Gegenwart von L-Leucin (pH = 7,5) bestimmt. Die Abhängigkeit der Aktivität von der Temperatur zeigte Anomalien, die durch L-Leucin weitgehend unterdrückt werden und durch temperaturabhängige Konformationsänderungen erklärt werden.

7. Das pH-Optimum für die Katalyse liegt bei pH = 8,2. Bei pH-Werten über 8,5 und unter 7,0 erfolgt eine Inaktivierung des Enzyms.

8. Als Substratsättigungsmechanismus wird der "Rapid-Equilibrium-

Random-BiBi"-Mechanismus angenommen: die Produkte CoA-SH und IPM hemmen kompetitiv gegenüber beiden Substraten. Für das Substrat KIV wurde ein gemittelter $K_m \sim K_{0,5}$-Wert von 6×10^{-5} M und für Ac~SCoA ein gemittelter $K_m \sim K_{0,5} = 7,5 \times 10^{-5}$ M bestimmt.
Die Kurven der Substratsättigung entsprechen nicht einer Michaelis-Menten-Kinetik, sondern durchlaufen Zwischenplateaus oder Maxima und werden in der Literatur als "bumpy curves" bezeichnet.
Die homotropen Effekte wechseln mit zunehmender Substratsättigung von positiver zu negativer und wieder zu positiver Kooperativität. Zur Erklärung der Befunde werden substratinduzierte Konformationsänderungen angenommen. Die maximalen Hill-Koeffizienten ergeben mindestens drei Bindungsstellen für KIV und mindestens vier für Ac~SCoA.
Die Vorstellungen über das Enzym sind nur mit dem Sequentiellen Mechanismus nach KOSHLAND et al. vereinbar.

9. Das Produkt CoA-SH (1 µM) sowie SH-Reagenzien inaktivieren das Enzym. Mögliche Angriffspunkte werden diskutiert.

10. Die Substratspezifität der IPM-Synthase ist sowohl bezüglich der α-Ketosäure als auch der Acyl-Verbindung gering. So werden Pyruvat ($K_{0,5} = 1 \times 10^{-2}$ M), α-Ketobutyrat ($K_{0,5} = 1,8 \times 10^{-3}$ M), α-Keto-n-valerat ($K_{0,5} = 5 \times 10^{-4}$ M), α-KIV-Methylester ($K_{0,5} = 5 \times 10^{-3}$ M) sowie Propionyl~SCoA ($K_m = 1,1 \times 10^{-4}$ M), Butyryl~SCoA ($K_m = 4 \times 10^{-4}$ M), Valeryl~, Malonyl~SCoA ($K_m = 5 \times 10^{-4}$ M), Crotonyl~SCoA ($K_m = 9 \times 10^{-4}$ M) und 3'Dephospho-acetyl~SCoA ($K_m = 1,2 \times 10^{-4}$ M) umgesetzt.
Für α-Ketobutyrat mit Acetyl~, Butyryl~ und Malonyl~SCoA und für Pyruvat mit Propionyl~, Malonyl~ und Butyryl~SCoA wurden höhere Umsatzgeschwindigkeiten als mit den "natürlichen" Substraten KIV und Ac~SCoA gemessen, desgleichen mit Butyryl~SCoA und KIV.
α-Ketoisocaproat und 2-Keto-3-Methylvalerat, die Ketoanalogen von Leucin und Isoleucin, sowie Glyoxylat und die höheren homologen α-Ketosäuren

wurden ebenso wie Caproyl~ und Palmityl~SCoA in erfaßbarer Rate nicht mehr umgesetzt. Glyoxylat wird sehr wahrscheinlich nicht gebunden, während die anderen Substrat-analoge gebunden werden und die Reaktion mit KIV und Ac~SCoA hemmen. Palmityl~SCoA wirkt wahrscheinlich als Detergenz.

11. Auf Grund der Wirkung der analogen Verbindungen wird diskutiert, welche Molekülgruppierungen der Substrate bei der Bindung am Enzym beteiligt sind. An Hand der Umsetzung bei niedrigen Konzentrationen wird versucht, die physiologische Bedeutung der aufgezeigten Unspezifität abzuschätzen.

12. Die Aktivität der IPM-Synthase wird durch L-Leucin gehemmt. Aus der modifizierten Hill-Auftragung ergeben sich wenigstens zwei allosterische Bindungszentren. Für niedrige L-Leucinkonzentrationen ergibt sich aus der Dixon-Auftragung ein nicht kompetitiver Hemmechanismus gegenüber KIV (app. $K_i = 2 \times 10^{-4}$ M bei pH = 8,1) und ein kompetitiver gegenüber Ac~SCoA (app. $K_i = 1 \times 10^{-6}$ M bei pH = 7,35 und $2,5 \times 10^{-5}$ M bei pH = 8,1). Die Hemmung ist stark pH-abhängig, die maximale Hemmung erfolgt bei pH = 7,4. Der Hemmechanismus ändert sich durch einen pH-Wechsel nicht. L-Leucin ändert sowohl den v_{max}- als auch den $K_{0,5}$-Wert für KIV.

13. Andere L- und D-Aminosäuren, mit Ausnahme von L- und D-Histidin, zeigten weder bei pH = 8,1 noch bei pH = 7,5 eine signifikante Wirkung. Die Hemmung durch L- und D-Histidin wird auf eine unphysiologische Reaktion zurückgeführt.

14. Eine Aufhebung der durch L-Leucin verursachten Hemmung erfolgte durch Strukturanaloge, wobei der Reaktion von L-Isoleucin und L-Valin physiologische Bedeutung zugemessen wird. Die Aufhebung der Hemmung nimmt mit steigender Konzentration des Effektors zu. Das pH-Optimum für

die Wirkung von L-Valin liegt bei pH = 7,5, so daß in Anwesenheit von L-Valin das pH-Optimum für die Hemmung durch L-Leucin von pH = 7,4 auf pH = 7,0 verschoben wird.
L-Valin zeigte einen Einfluß auf die Stabilität des Enzyms im Rohextrakt, auf die Inaktivierung durch EDTA und durch CoA-SH, auf die Temperaturanomalie und auf das Temperaturoptimum der Katalyse.
Im dialysierten Extrakt des angereicherten Enzyms konnte keine aktivierende Wirkung von L-Valin auf die Enzymaktivität in Abwesenheit von L-Leucin festgestellt werden.

15. Aus dem Vergleich der gefundenen Eigenschaften der IPM-Synthase aus H. eutropha H 16 - A 81 mit den aus der Literatur entnommenen Werten für die - zumindest teilweise - angereicherten Enzyme aus verschiedenen Organismen lassen sich keine generellen Unterschiede zwischen bakteriellen und pilzlichen IPM-Synthasen aufzeigen, obwohl sich die einzelnen Enzyme z.T. sehr stark voneinander unterscheiden.

LITERATURVERZEICHNIS

ABELSON, P.H. VOGEL, H.J. 1955 Aminoacid biosynthesis in Torulopsis utilis and Neurospora crassa. J. Biol. Chem. 213, 355.

ACKERS, G.K. 1964 Molecular exclusion and restricted diffusion processes in molecularsieve chromatography. Biochemistry 3, 723 - 730.

AHRENS, W. 1970 CO_2-bedürftige Mutanten von Hydrogenomonas H 16. Diss. Göttingen.

ANDREWS, P. 1962 Estimation of molecular weights of proteins by gel filtration. Nature 196, 36 - 39.

ATKINSON, D.E. 1966 Regulation of enzyme activity. Ann. Rev. Biochem. 35, 85 - 124.

BARMAN, Th.E. 1969 Enzyme Handbook, Vol. I, II. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

BARTSCH, R.G. 1956 Reactions of unsaturated fatty acids in Clostridium kluyveri extracts. Diss. Universität California (USA).

BAUMGARTEN, J. 1969 Die Regulation der Synthese von Isoleucin, Valin und Leucin bei Arthrobacter St. 23. Diss. Göttingen.

BEISENHERZ, G. BOLZE, H.J. BÜCHER, Th. CZOK, R. GARBADE, H.K. MEYER-ARENDT, E. PFLEIDERER, G. 1953 Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z. Naturf. 8 B, 555 - 557.

BENTLEY, R. 1969/70 Molecular Asymmetry in Biology. Academic Press, New York, Vol. 1 und 2.

BLAIR, A.H.
BARKER, H.A. 1966 Assay and purification of (+)-citramalate hydrolyase components from Clostridium tetanomorphum.
J. Biol. Chem. 241, 400 - 408.

BLATT, J.M.
UMBARGER, H.E. 1972 On the role of isoleucyl-tRNA synthetase in multivalent repression.
Biochem. Genetics 6, 99 - 118.

de BOER, Th.J.
BACKER, H.J. 1954a Cycloheptanone.
Org. Syn. 34, 24 - 26.

de BOER, Th.J.
BACKER, H.J. 1954b p-Tolylsulfonylmethyl-nitrosamide.
Org. Syn. 34, 96 - 100.

BOLLON, A.P.
MAGEE, P.T. 1973 Involvement of threonine deaminase in repression of the isoleucine-valin and leucine pathways in Saccharomyces cerevisiae.
J. Bact. 113, 1333 - 1344.

BORTZ, W.W.
LYNEN, F. 1963 The inhibition of acetyl-CoA carboxylase by long chain acyl-CoA-derivatives.
Biochem. Z. 337, 505 - 509.

BURNS, R.O.
CALVO, J.M.
MARGOLIN, P.
UMBARGER, H.E. 1966 The expression of the leucine operon.
J. Bact. 91, 1570 - 1576.

BURNS, R.O.
UMBARGER, H.E.
GROSS, S.R. 1963 The biosynthesis of leucine.
III. The conversion of α-hydroxy-ß-carboxyisocaproate to α-ketoisocaproate.
Biochemistry 2, 1053 - 1058.

CALVO, J.M.
BARTHOLOMEW, J.C.
STIEGLITZ, B.I. 1969 Fluorometric assay of enzymatic reactions involving acetyl coenzym A in aldol condensations.
Anal. Biochem. 28, 164 - 181.

CALVO, R.A.
CALVO, J.M. 1967 Lack of end-product inhibition and repression of leucine synthesis in a strain of Salmonella typhimurium.
Science 156, 1107 - 1109.

CALVO, J.M.
KALYANPUR, M.G.
STEVENS, C.M. 1962 2-Isopropylmalate and 3-Isopropylmalate as intermediates in leucine biosynthesis. Biochemistry 1, 1157 - 1161.

CALVO, J.M.
UMBARGER, H.E. 1963 Feedback control of leucine biosynthesis in Salmonella typhimurium. Bacteriol. Proc., S. 126.

CANOVAS, J.L.
RUIZ-AMIL, M.
LOSADA, M. 1965 Condensation of α-ketobutyrate and acetyl-CoA in Baker's yeast. Arch. Mikrobiol. 50, 164 - 170.

CHANGEUX, J.P. 1963 Allosteric interactions on biosynthetic L-threonine desaminase from E. coli K 12. Cold Spring Harb. Symp. quant. biol. 28, 497 - 504.

CLELAND, W.W. 1963 The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations. Biochim. Biophys. Acta 67, 104 - 137.

II. Inhibition: Nomenclature and theory. Biochim. Biophys. Acta 67, 138 - 187.

COLLINS, M.
WAGNER, R.P. 1973 Branched chain amino acid aminotransferases of Neurospora crassa. Arch. Biochem. Biophys. 155, 184 - 193.

CONWAY, A.
KOSHLAND, D.E.,jr. 1968 Negative cooperativity in enzyme action. The binding of diphosphopyridine nucleotide to glyceraldehyd 3-phosphate dehydrogenase. Biochemistry 7, 4011 - 1023.

CSOPAK, H.
FALK, K.-E.
SZAJN, H. 1972 Effect of EDTA on Escherichia coli alkaline phosphatase. Biochim. Biophys. Acta 258, 466 - 472.

DATTA, P. 1971 Homoserine dehydrogenase of Rhodospirillum rubrum. J. Biol. Chem. 245, 5779 - 5787.

DAVIS, B.J. 1964 Disc-elektrophoresis. II. Methods and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci. US 121, 404 - 427.

DAWSON, R.M.C.
ELLIOTT, D.C.
JONES, K.M.
ELLIOTT, W.H.
1969 Data for Biochemical Research. Oxford, At the Clarendon Press, 2nd edition.

DEMAIN, A.L. 1971 Increasing enzyme production by genetic and environmental manipulations. In: Methods in Enzymology, Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (edts.). Acad. Press New York-London, 22, 86 - 95.

DIXON, M.
WEBB, E.C.
1964 Enzymes. Longmans, 2nd Ed., London.

DORSEY, J.A.
PORTER, J.W.
1968 The effect of palmityl-coenzym A on pigeon-liver-fatty-acid synthetase. J. Biol. Chem. 243, 3512 - 3516.

EGGERER, H. 1965 Zum Mechanismus der biologischen Umwandlung von Citronensäure: IV. Citratsynthase ist eine Acetyl-CoA-Enolase. Biochem. Z. 343, 111 - 138.

EGGERER, H.
KLETTE, A.
1967 Über das Katalysenprinzip der Malat-synthase. Eur. J. Biochem. 1, 447 - 475.

EHRENSVÄRD, G.
REIO, L.
SALUSTE, E.
STJERNHOLM, R.
1951 Acetic acid metabolism in Torulopsis utilis: III. Metabolic connection between acetic acid and various amino acids. J. Biol. Chem. 189, 93 - 108.

EHRLICH, F. 1907 Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe. Chem. Ber. 40, 1207 - 1047.

ELLMANN, C.L. 1959 Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82, 70 - 77.

FISCHER, H. 1973 Reinigung der α-Isopropylmalat-Synthase aus Micrococcus denitrificans und enzymkinetische Messungen. Diplomarbeit Göttingen.

FREUNDLICH, M.
BURNS, R.O.
UMBARGER, H.E.
1962 Control of isoleucine, valine, and leucine biosynthesis. I. Multivalent repression. Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 1804 - 1808.

FREUNDLICH, M. CLARKE, L.P.	1968	Control of isoleucine, valine, and leucine biosynthesis. V. Dual effect of α-amino-butyric acid on repression and endproduct inhibition in Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta 170, 271 - 281.
GAREN, A. OTSUJI, N.	1964	Isolation of a protein specified by a regulator gene. J. Mol. Biol. 8, 841 - 852.
GILBERT, W. MÜLLER-HILL, B.	1966	Isolation of the lac-repressor. Proc. Nat. Acad. Sci. US 56, 1891 - 1898.
GOTTSCHALK, G. DITTBRENNER, S.	1970	Properties of (R)-citratsynthase from Clostridium acidi-urici. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1183 - 1190.
GROSS, S.R.	1965	The regulation of synthesis of leucine biosynthetic enzymes in Neurospora. Proc. Nat. Acad. Sci. 54, 1538 - 1546.
GROSS, S.R. BURNS, R.O. UMBARGER, H.E.	1963	The biosynthesis of leucine. II. The enzymic isomerization of ß-carboxy-ß-hydroxyiso-caproate. Biochemistry 2, 1046 - 1052.
GROSS, S.R. JUNGWIRTH, C. UMBARGER, H.E.	1962	Another intermediate in leucine biosynthesis. Biochem. Biophys. Res. Comm. 7, 5 - 9.
GUYMON, J.F.	1966	Mutant strains of Saccharomyces cerevisae applied to studies in higher alcohol formation during fermentation. Developments in Industrial Microbiology Vol. 7, S. 88 - 96.
GUYMON, J.F. INGRAHAM, J.L. CROWELL, E.A.	1961	The formation of n-propylalcohol by Saccharomyces cerevisiae. Arch. Biochem. Biophys. 95, 163 - 168.
HAN, M.H.	1972	Non-linear Arrhenius plots in temperature-dependent kinetic studies of enzyme reaction. I. Single transition processes. J. theor. Biol. 35, 543 - 568.

HARTLEY, B.S. 1973 The evolution of enzymes. Ninth International Congress of Biochemistry. Stockholm 1 - 7 Juli 1973.

HAYES, M.B. WELLNER, D. 1969 Microheterogeneity of L-amino acid oxidase. J. Biol. Chem. 244, 6636 - 6644.

HILL, F.F. 1968 Regulation der Leucinsynthese und Trifluorleucinresistenz bei Hydrogenomonas H 16. Diss. Göttingen.

HORVATH, J. VARGA, J.M. SZENTIRMAI, A. 1964 Control of valine and isoleucine metabolism in Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli. J. Gen. Microbiol. 34, 241 - 248.

IMAI, K. REEVES, H.C. AJE, S.J. 1963 n-Propylmalate synthetase. J. Biol. Chem. 238, 3193 - 3198.

IMAI, K. REEVES, H.C. RABIN, R. AJL, S.L. 1964 Synthesis and breakdown of n-propylmalic acid. Biochim. Biophys. Acta 81, 367 - 376.

INGRAHAM, J.L. GUYMON, J.F. 1960 The formation of higher aliphatic alcohols, by mutant strains of Saccharomyces cerevisae. Arch. Biochem. Biophys. 88, 157 - 166.

INGRAHAM, J.L. GUYMON, J.F. CROWELL, E.A. 1961 The pathway of formation of n-butyl and n-amyl alcohols by a mutant strain of Saccharomyces cerevisae. Arch. Biochem. Biophys. 95, 169 - 175.

JENSEN, R.A. 1969 Metabolic interlock. Regulatory interactions exerted between biochemical pathways. J. Biol. Chem. 244, 2816 - 2823.

Le JOHN, H.B. JACKSON, A. 1968 Allosteric interactions of a regulatory nicotinamide adenine dinucleotide-specific glutamate dehydrogenase from Blastocladiella. J. Biol. Chem. 243, 3447 - 3457.

JUNGWIRTH, C. GROSS, S.R. MARGOLIN, P. UMBARGER, H.E. 1963 The biosynthesis of leucine. I. The accumulation of ß-carboxy-ß-hydroxy isocaproate by leucine auxotrophs of Salmonella typhimurium and Neurospora crassa. Biochemistry 2, 1 - 6

JUNGWIRTH, C.
MARGOLIN, P.
UMBARGER, H.E.
GROSS, S.R.
1961 The initial step in leucine biosynthesis. Biochem. Biophys. Res. Comm. 5, 435 - 438.

JUNI, E.
HEYM, G.
1968 Properties of yeast pyruvate decarboxylase and their modification by proteolytic enzymes. Arch. Biochem. Biophys. 127, 79 - 88.

KAPOOR, M.
TRONSGAARD, T.M.
1972 Conformational changes of Neurospora pyruvate-kinase induced by TRIS-buffer. FEBS-Letter 23, 349 - 351.

KATSUKI, H.
ARIGA, N.
KATSUKI, F.
NAGAI, J.
EGASHIRA, S.
TANAKA, S.
1962 Enzymic hydration of mesaconate by Pseudomonas fluorescens. Biochem. Biophys. Acta 56, 545 - 551.

KIRITANI, K.
NARISE, S.
WAGNER, R.P.
1965 The overall in vitro synthesis of valine from pyruvate by Neurospora homogenates. Biochim. Biophys. Acta 100, 432 - 443.

KOHLHAW, G.
1970 Number and reactivity of the sulfhydryl groups of α-isopropylmalate synthase of Salmonella typhimurium. Biochim. Biophys. Acta 212, 58 - 64.

KOHLHAW, G.
BOATMAN, G.
1971 Cross-linking of Salmonella isopropylmalate synthase with dimethyl suberimidate; evidence for antagonistic effects of leucine and acetyl-CoA on the quaternary structure. Biochem. Biophys. Res. Comm. 43, 741 - 746.

KOHLHAW, G.
LEARY, T.R.
UMBARGER, H.E.
1969 α-Isopropylmalate synthase from Salmonella typhimurium. Purification and properties. J. Biol. Chem. 244, 2218 - 2225.

KOSHLAND, D.E.,jr.
NÉMETHY, G.
FILMER, D.
1969 Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. Biochemistry 5, 365 - 385.

KUMAR, S.
MUESING, R.A.
PORTER, J.W.
1972 Conformational changes, inactivation and dissociation of pigeon liver-fatty-acid-synthetase-complex. J. Biol. Chem. 247, 4749 - 4762.

LEARY, T.R.
KOHLHAW, G. 1970 Dissociation of α-isopropylmalate synthase from Salmonella typhimurium by its feedback inhibitor leucine.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 39, 494 - 501.

LEE, J.J.
BERNS, D.S. 1968 Protein aggregation.
Biochem. J. 110, 465 - 470.

LERCH, B.
WOLF, G. 1971 Isolation of phosphodiesterase from sugar beet leaves.
Biochim. Biophys. Acta 258, 206 - 218.

LEVITZKI, A.
KOSHLAND, D.E.,jr. 1969 Negative cooperativity in regulatory enzymes.
Proc. Nat. Acad. Sci. US 62, 1121 - 1128.

LOW, P.S.
BADA, J.L.
SOMERO, G.N. 1973 Temperature adaptation of enzymes: role of the free energy, the enthalpy and the entropy of activation.
Proc. Nat. Acad. Sci. US 70, 430 - 432.

LOWRY, O.H.
CARTER, J.
WARD, J.B.
GLASER, L. 1971 The effect of carbon and nitrogen sources on the level of metabolic intermediates in Escherichia coli.
J. Biol. Chem. 246, 6511 - 6521.

LOWRY, C.H.
ROSENBROUGH, N.J.
FARR. A.L.
RANDALL, R.J. 1951 Protein measurement with the folinphenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275.

LYNEN, F. 1972 Molecular Bioenergetics and Micromolecular Biochemistry.
Weber, H.H. ed., Springer Verlag Heidelberg-New York-Berlin, S. 30 - 55.

MA, P.F.
FISHER, J.R. 1966 Adenosine deaminase - some evolutionary trends among vertebrates.
Comp. Biochem. Physiol. 19, 799 - 807.

MAHLER, M.R.
CORDES, E.H. 1961 Biological Chemistry.
Harper International Edts. Harper u. Row, New York.

MALMSTRÖM, B.G.
ROSENBERG, A. 1959 Mechanism of metallion activation of enzymes.
Adv. Enzymol. 21, 131 - 167.

MARTIN, R.G.
AMES, B.N. 1961 A method for determining the sedimentation behavior of enzymes. Application to protein mixtures.
J. Biol. Chem. 236, 1372 - 1379.

MARTIN, W.R.
COLEMAN, W.H.
WIDBURG, N.E.
CANTRELL, R.
JACKSON, M.
DENISON, F.W. 1962 ß-carboxy-ß-hydroxyisocaproate formation by microorganisms.
Biochim. Biophys. Acta 62, 165 - 167.

MAYHEW, S.G.
HOWELL, L.G. 1971 Chromatography of proteins on diethylamino-ethylcellulose in concentrated ammonium sulfate.
Anal. Biochem. 41, 466 - 470.

MIDDLETON, B. 1967 The mechanism of synthesis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A.
Biochem. J. 103, 6p.

MONOD, J.
WYMAN, J.
CHANGEUX, J.P. 1965 On the nature of allosteric transition: a plausible model.
J. Mol. Biol. 12, 88 - 118.

NEUBAUER, O.
FROMHERZ, K. 1911 Über den Abbau der Aminosäuren bei der Hefegärung.
Z. physiol. Chem. 70, 326 - 350.

OAKS, A. 1965 The synthesis of leucine in maize embryos.
Biochim. Biophys. Acta 111, 79 - 89.

OCHOA, S. 1955 Crystalline condensing enzyme from pig heart.
In: Methods in Enzymology. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (edts.). Acad. Press N.Y. 1, 685 - 694.

OEDING, V. 1972 Regulation des Poly-ß-hydroxybuttersäure-Stoffwechsels bei Hydrogenomonas eutropha Stamm H 16 und PHBS-freie Mutanten.
Diss. Göttingen.

O'NEILL, J.P.
FREUNDLICH, M. 1972 Two forms of biosynthetic acetohydroxy acid synthetase in Salmonella typhimurium.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 48, 437 - 443.

PARVIN, R.
ATKINSON, D.E. 1968 Purification and some properties of yeast citrate synthase.
Arch. Biochem. Biophys. 128, 528 - 533.

PATTE, J.D.
LOVING, T.
COHEN, G.N. 1965 Effects inhibiteurs cooperatifs de la L-Lysine avec d'autres amine acides sur une aspartokinase de Escherichia coli.
Biochim. Biophys. Acta 99, 523 - 530.

PFENNIG, N.
LIPPERT, K.D. 1966 Über das Vitamin B_{12}-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien.
Arch. Mikrobiol. 55, 245 - 256.

PIZER, L.I.
POTOCHNY, M.L. 1964 Nutritional and regulatory aspects of serine metabolism in Escherichia coli.
J. Bact. 88, 611 - 619.

RABIN, R.
REEVES, H.C.
AJL, S.J. 1963 ß-ethylmalate synthetase.
J. Bact. 86, 937 - 944.

RABIN, R.
SALOMON, I.I.
BLEIWEIS, J.C.
SAMUEL, J.A. 1968 Metabolism of ethylmalic acids by Pseudomonas aeruginosa.
Biochemistry 7, 377 - 388.

REEVES, H.C.
PAPA, M.
SEAMEN, G.
AJL, S.J. 1961 Malate synthetase and isocitritase in Tetrahymena pyriformis.
J. Bact. 81, 154 - 155.

REEVES, H.C.
STAHL, W.J.
AJL, S.J. 1963 α-hydroxy glutarate: production of an enzymatic ß-condensation between glyoxylate and propionyl-coenzyme A.
J. Bact. 86, 1352 - 1353.

REH, M. 1967 Regulation der Synthese von Isoleucin und Valin durch Hydrogenomonas H 16.
Diss. Göttingen.

ROBYT, J.
ACKERMAN, R.J.
CHITTENDEN, C.G. 1971 Reaction of protein disulfide groups with Ellman's reagent: a case study of the number of sulfhydryl and disulfide groups in Aspergillus oryzae α-amylase, papain and lysozyme.
Arch. Biochem. Biophys. 147, 262 - 269.

ROGERSON, A.C.
FREUNDLICH, M. 1970 Control of mechanism of growth inhibition Control of isoleucine, valine and leucine biosynthesis VIII. Biochim. Biophys. Acta 208, 87 - 98.

RUDMAN, D.
MEISTER, A. 1953 Transamination in Escherichia coli. J. Biol. Chem. 200, 591 - 604.

SAI, T.
AIDA, K.
UEMURA, T. 1969 Studies on (-)-citramalic acid formation by respiration-deficient yeast mutants. V. Purification and some properties of citramalate condensing enzyme. J. Gen. Appl. Microbiol. 15, 345 - 363.

SAI, T.
AMAHA, M. 1965 Accumulation of (-)-citramalic acid by respiration-deficient mutants of Brewers' yeast. J. Gen. Appl. Microbiol. 11, 355 - 365.

SATYANARAYANA, T.
UMBARGER, H.E.
LINDEGREN, G. 1968a Biosynthesis of branched-chain amino acids in yeast: correlation of biochemical blocks and genetic lesions in leucine auxotrophs. J. Bact. 96, 2012 - 2017.

SATYANARAYANA, T.
UMBARGER, H.E.
LINDEGREN, G. 1968b Biosynthesis of branched-chain amino acids in yeast: regulation of leucine biosynthesis in prototrophic and leucine auxotrophic strains. J. Bact. 96, 2018 - 2024.

SCHACHMANN, H.K. 1959 Ultracentrifugation in Biochemistry. Acad. Press N.Y. and London.

SCHLEGEL, H.G.
KALTWASSER, H.
GOTTSCHALK, G. 1961 Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen. Arch. Mikrobiol. 38, 209 - 222.

SCHLEIDEN, M.J. 1838 Beiträge zur Phytogenesis Müller's Arch. für Anat. und Physiol. Jg. 1838, 137 - 176, abgedruckt in Schleiden Beiträge zur Botanik Bd. I, S. 121 - 159, Leipzig 1844.

SCHWANN, Th. 1839 Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Tiere und Pflanzen (1839). In: Ostwald's Klassiker der exakten Wissenschaft Nr. 176, Leipzig 1910.

SHUKUYA, R.
SCHWERT, G. W. 1960 Glutamatic acid decarboxylase: III. The inactivation of the enzyme at low temperatures.
J. Biol. Chem. 235, 1658 - 1661.

SIMON, E. J.
SHEMIN, D. 1953 The preparation of S-succinyl-coenzyme A.
J. Amer. chem. Soc. 75, 2520.

SMITH, S. 1971 The effect on ^2H_2O on the quarternary structure of the fatty-acid-synthetase-multienzyme-complex.
Biochim. Biophys. Acta 251, 477 - 481.

SOBERANO, M. E.
SCHOELLMANN, G. 1972 Anomalous kinetics observed in the catalysis of a peptide substrate with collagenase.
Biochim. Biophys. Acta 289, 401 - 404.

SRERE, P. A. 1965 Palmityl coenzyme A inhibition of the citrate condensing enzyme.
Biochim. Biophys. Acta 106, 445 - 455.

STEGEMANN, H. 1972 Apparatur zur thermokonstanten Elektrophorese und Fokussierung und ihre Zusatzteile.
Z. Anal. Chemie 261, 388 - 391.

STEWART, P. R.
RUDNEY, H. 1966 The biosynthesis of ß-hydroxy-ß-methylglutaryl coenzyme A in yeast.
J. Biol. Chem. 241, 1222 - 1225.

STRASSMAN, M.
CECI, L. N. 1963 Enzymatic formation of α-isopropylmalic acid, an intermediate in leucine biosynthesis.
J. Biol. Chem 238, 2445 - 2453.

STRASSMAN, M.
CECI, L. N. 1967 A study of acetyl-CoA condensation with α-ketoacids.
Arch. Biochem. Biophys. 119, 420 - 428.

STRASSMAN, M.
LOCKE, L. A.
THOMAS, A. J.
WEINHOUSE, S. 1955 A study of leucine biosynthesis in Torulopsis utilis.
Science 121, 303 - 304.

STRASSMAN, M.
LOCKE, L. A.
THOMAS, A. J.
WEINHOUSE, S. 1956 A study of leucine biosynthesis in Torulopsis utilis.
J. Am. Chem. Soc. 78, 1599 - 1602.

TALSKY, G. 1971 Zur anomalen Temperaturabhängigkeit enzymkatalysierter Reaktionen. Angew. Chem. 83, 553 - 594.

TAYLOR, A.L. 1967 Revised linkage map of Escherichia coli.
TROTTER, C.D. Bact. Rev. 31, 332 - 353.

TEIPEL, J. 1969 The significance of intermediary plateau
KOSHLAND, D.E.,jr regions in enzyme saturation curves. Biochemistry 8, 4656 - 4663.

TUBBS, P.K. 1963 Inhibition of citrate formation by long chain acyl thioesters of CoA as a possible control mechanism in fatty acid biosynthesis. Biochim. Biophys. Acta 70, 608 - 609.

ULICH, H. 1963 Kurzes Lehrbuch der Physikalischen Chemie.
JOST, W. Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt.

ULM, E.H. 1972 α-Isopropylmalate synthase from yeast:
BÖHME, R. Purification, kinetic studies, and effect
KOHLHAW, G. of ligands on stability. J. Bact. 110, 1118 - 1126.

UMBARGER, H.E. 1958 Isoleucine and valine metabolism in
BROWN, B. Escherichia coli. VIII. The formation of acetolactate. J. Biol. Chem. 233, 1156 - 1160.

UMBARGER, H.E. 1965 The end product sensitive enzymes in the
SIU, P.L.M. pathway of the branched chain amino acids
CALVO, J.M. and serine.
FREUNDLICH, M. Colloq. Int. Centre Natl. Rech. Sci. (Paris) 134, 217 - 282.

VAGELOS, P.R. 1971 Regulation on fatty acid biosynthesis. In: Current Topics in Cellular Regulations, ed. by B.L. Hozecker und E.R. Stadtman, Vol. 4.

VALLEE, B.L. 1955 Zinc and metalloenzymes. Adv. Protein Chem. 10, 317 - 384.

VALLEE, B.L. 1970 Metalloproteins.
WACKER, W.E.C. In: The Proteins Bd. V (Hrsg. H. Neurath), Academic Press New York u. London.

WARBURG, O. 1949 Heavy Metal Prosthetic Groups and Enzyme Action.
Oxford Univ. Press (Clarendon), London - New York.

WARBURG, O.
CHRISTIAN, W. 1941 Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase
Biochem. Z. 310, 384 - 421.

WASMUTH, J.
UMBARGER, H. E.
DEMPSEY, W. B. 1973 A role for pyridoxine derivative in the multivalent repression of the isoleucine and valine biosynthetic enzymes.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 51, 158 - 165.

WEAST, R. C. 1968/69 Handbook of Chemistry.
Cleaveland, The Chemical Rubber and Co.

WEBB, A. D.
INGRAHAM, J. L. 1963 Fusel oil.
Adv. Appl. Microbiol. 5, 317 - 353.

WEBSTER, R. E.
GROSS, S. R. 1965 The α-isopropylmalate synthetase of Neurospora.
I. The kinetics and endproduct control of α-isopropylmalate synthetase function.
Biochemistry 4, 2309 - 2318.

WEBSTER, R. E.
NELSON, C. A.
GROSS, S. R. 1965 The α-isopropylmalate synthetase of Neurospora: II. The relation between structure and complementation interactions.
Biochemistry 4, 2319 - 2327.

WEGENER, W. S.
REEVES, H. C.
AJL, S. J. 1965 Heterogeneity of the glyoxylate-condensing enzymes.
J. Bact. 90, 594 - 598.

WEGENER, W. S.
REEVES, H. C.
RABIN, R.
AJL, S. J. 1968 Alternate pathway of metabolism of short-chain fatty acids.
Bact. Rev. 32, 1 - 26.

WESTERFELD, W. W. 1945 Acolorimetric determination of blood acetoin.
J. Biol. Chem. 161, 495 - 502.

WIELAND, O.
WEISS, L. 1963 Inhibition of citrate-synthase by palmityl-coenzyme A.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 13, 26 - 31.

WILDE, E. 1962 Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von Hydrogenomonas. Arch. Mikrobiol. 43, 109 - 137.

WILLIAMS, D. E.
REISFELD, R. A. 1964 Disc-electrophoresis in polyacryl amide gels. Extensions to new conditions of pH and buffer. Ann. N. Y. Acad. Sci. US 121, 373 - 381.

WONG, D. T. O.
AJL, S. J. 1956 Conversion of acetate and glyoxylate to malate. J. Am. chem. Soc. 78, 3230 - 3231.

WRIGLEY, C. 1968 Analytical fractionation of plant and animal proteins by gel electrofocussing. J. Chromatogr. 36, 362 - 365.

LEBENSLAUF

2. 4. 1941	geboren in Berlin-Spandau, als zweiter Sohn des Diakons und Volkspflegers Kurt Wiegel (1947 in russ. Gefangenschaft verstorben) und der Kindergärtnerin und Krankenschwester Agnes Wiegel, geb. Franke.
Sept. 1947 bis Sept. 1954	Besuch der 20. Grundschule in Bln.-Spandau (Klasse 1 - 6) und der Freiherr-vom-Stein-Schule (Gymnasium, Klasse 7)
März 1958	Abschluß der I. Oberschule Technischen Zweiges in Bln. Spandau (Mittlere Reife)
März 1960	Gärtner-Gehilfenprüfung im Topf- und Zierpflanzenbau nach zweijähriger Lehre (Gärtnerei Eggers, Göttingen)
April 1960 bis März 1961	Berufspraxis in Bln.-Spandau, Gärtnerei Ev. Johannesstift
März 1964	Abitur am Braunschweig-Kolleg (Schule für Erwachsene)
Mai 1964	Immatrikulation an der Georgia-Augusta-Universität Göttingen im Fach Mikrobiologie
Juli 1968	Vordiplom in Chemie
Oktober 1969	Diplomhauptprüfung in org. Chemie (Thema der Arbeit "Chemische Synthese von Desoxyribonukleotiden und Desoxyribooligonukleotiden mit wiederkehrender Dinukleotidsequenz" bei Priv.-Doz. W. Müller, Göttingen)
Seit November 1969	Wissenschaftl. Mitarbeiter im Institut für Mikrobiologie (Göttingen) der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, München
März 1970	Beginn der experimentellen Arbeit zur vorliegenden Dissertation

Meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. H.G. Schlegel, danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit, für die Überlassung des Themas und für die mir stets gewährte Unterstützung.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. G. Wolf für die Anleitung zur präparativen Gelelektrophorese, sowie Herrn Dr. J. Baumgarten und Herrn Dr. M. Reh für die Überlassung von Mutanten und anregende Diskussionen.